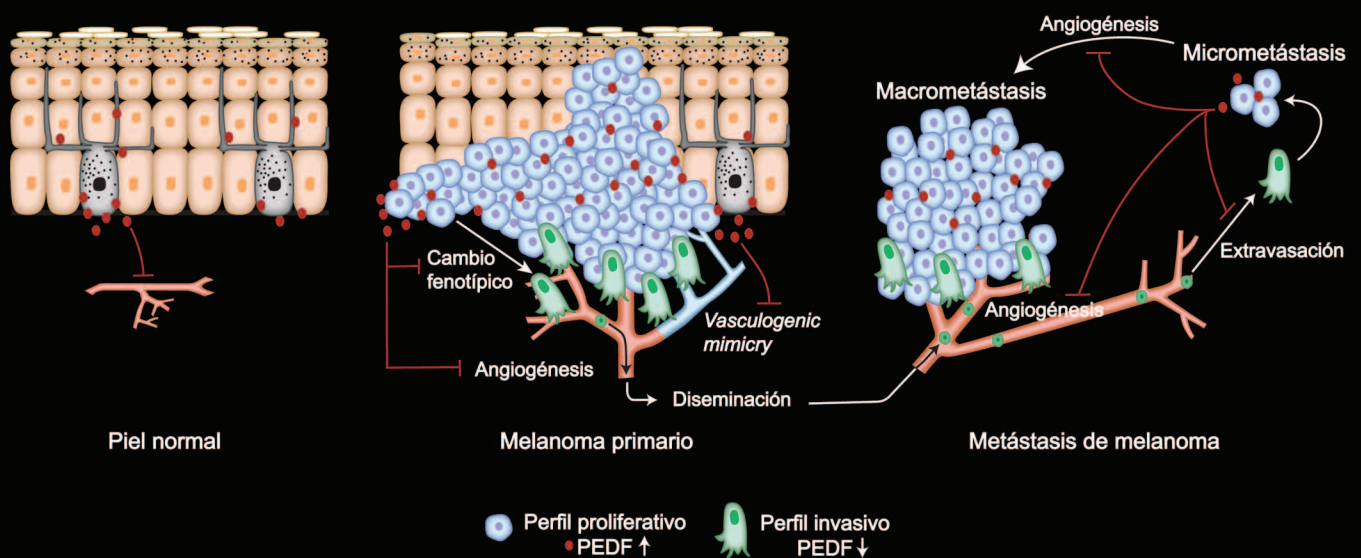


# Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión del factor derivado del epitelio pigmentario en la progresión maligna del melanoma humano







**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Departamento de Bioquímica**

**Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión del factor  
derivado del epitelio pigmentario en la progresión maligna  
del melanoma humano**

**José Luis Orgaz Bueno**  
**Madrid, 2009**



**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid**

**Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión del factor  
derivado del epitelio pigmentario en la progresión maligna  
del melanoma humano**

**José Luis Orgaz Bueno  
Licenciado en Biología**

**Directora de Tesis:  
Dra. Benilde Jiménez Cuenca**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Madrid  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad Autónoma de Madrid**



Benilde Jiménez Cuenca, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que D. José Luis Orgaz Bueno, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión del factor derivado del epitelio pigmentario en la progresión maligna del melanoma humano

y que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente y la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado.

Madrid, 9 de octubre de 2009.

Dra. Benilde Jiménez Cuenca





## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dándole las gracias a Benilde Jiménez, por permitirme formar parte de su laboratorio y transmitirme todo su conocimiento, por enseñarme, aparte de muchas técnicas, sobre todo, a que hay que pensar, y porque sin su ayuda esta Tesis no hubiese sido posible. En segundo lugar, gracias a mi predecesora Nuria. Aunque no coincidimos mucho tiempo, aprendí muchísimo a tu lado, más de lo que imaginas.

A mis compañeras de laboratorio Asun y Bea, gracias por todos los buenos momentos, que han sido muchos, tanto dentro como fuera del laboratorio, por vuestra ayuda y consejos, por alegrar el laboratorio cada día, y por ser mucho más que las mejores compañeras que se pueden tener. Gracias también a toda la gente que ha pasado por el laboratorio durante estos casi 5 años, especialmente Cristina, Sara, Iker, Patricia y, en los últimos tiempos, Sara, Fernando e Isabel.

Al grupo de Luis del Peso, muchas gracias Luis por tus consejos y ayuda siempre que lo he necesitado, a pesar de estar siempre muy ocupado. Y gracias al resto de “hipóxicos”, Marisa, Diego, Nuria, Amaya, Silvia, Laura, María, Eva, Soraya, por animar el laboratorio, por escuchar, y por esos dulces de cada semana. Y gracias especialmente a Mónica, hija adoptiva del IIBM, por tu simpatía y amistad.

Mención muy especial merece el laboratorio 231. Alberto, Teresa, Pepa, José y Óscar, gracias por vuestro interés y apoyo. No puedo olvidarme de las que ya no están, Noelia, Laura y Yajaira, gracias por todos los buenos ratos, y especialmente a Natalia, por tu ayuda desinteresada y permanente sonrisa. Y muchísimas gracias a los que siguen, por todo lo que he vivido con vosotros, trabajando, preparando videos o de fiesta, por vuestro apoyo en los momentos bajos, y por vuestra amistad. A pesar de no estar por aquí arriba, gracias a Diego por ser como eres. A Toño por todas tus increíbles historias, y por compartir alegrías y penas de predoctoral. A Fabio, por hacernos la vida más dulce y hacer de terapeuta. A Paloma, por ver siempre el lado positivo de todo. A Silvia, mucho más que mi compañera de escritura de Tesis, por animarme siempre que puedes. Y gracias especialmente a Chus, por todos tus consejos, generosidad, apoyo y mucho más y, sobre todo, por tu valiosa amistad.

A toda la gente con la que coincido en cultivos y pasillos, Irene, Josué, , Ángeles, Marina, Alberto, Óscar, Marga, Jaime., gracias por hacer más animado el trabajo con vuestras charlas y por vuestro interés; y a la gente del 141 y del 142, especialmente Alberto, María y Dani. Muchas gracias a Carmela Calés por tu constante interés y por resolver todas mis dudas citométricas. Gracias a Vero por todos los experimentos compartidos. Y gracias a Sergio Gascón, por enseñarme a preparar lentivirus, y por todos los buenos momentos.

Quiero agradecer también a toda la gente que hace que el IIBM funcione, sobre todo a Gemma y a la gente del Servicio de Secuenciación por vuestra ayuda con las RT-PCRs, especialmente a Diego y Diana; y a Javier, Ricardo y Antonio del Servicio de Imagen por su ayuda

con las figuras y la impresión de la Tesis. También agradezco a Ricardo Ramos del Parque Científico su ayuda con las RT-PCRs y a Alberto Benguría del CNIC su apoyo con los *microarrays*.

En el apartado colaboraciones, muchas gracias a todos por vuestra ayuda, sin ella este trabajo no hubiese llegado al nivel requerido. Especialmente, gracias a Antonio Bernad y su grupo del CNIC por su ayuda con los lentivirus y, sobre todo, a Piedad Fernández, por esas preparaciones tan maravillosas de lentivirus. Igualmente gracias a José Luis Rodríguez Peralto, por tu simpatía y buena disposición.

Regarding my collaborators abroad, thank you so much Keith Hoek for all your help and exciting discussions; and also thanks to Mary Hendrix's laboratory. To Olga Volpert, thank you very much for allowing me to stay in your lab during that wonderful summer, and later for all your expertise and help with the *in vivo* experiments. Many thanks also to all the people in Olga Volpert's lab, for helping make my stay there much nicer: Ahmed, Arin, Kelly, Yelena, Angela, and especially Dorina and Dauren, for your endless support and interest; Omar, for all the laughter and shared experiments (and for your guitar!), hope we will meet again someday; and Frank, for being my friend there and helping me much more than you will ever think. Also thanks to Anait Levenson, for all the helpful discussion (scientific or not).

A la gente del CNIC, gracias por todos los buenos momentos, tanto en todas las bodas como en fiestas y cenas: Tania, Ceci, Tarín, Dani, Gemma, Cris y Andrea, y a los no-CNIC Dani, Andrés y David.

A Carlos y Esther, empezamos en Biología, y aquí seguimos, espero que por mucho tiempo. Muchas gracias a los dos por todo. Y a Carlos Suárez, por hacer que el tiempo parezca que no pasa.

A Luisma y Sara, muchas gracias por ser como sois. Y gracias especiales a Luisma y Juanma por tantos años de música, risas y, sobre todo, amistad, espero que reactivemos el grupo, a pesar de los líos, y sigamos por mucho más tiempo.

A todos mis tíos y primos, gracias por vuestro apoyo y comprensión. Gracias a mi abuela, por su cariño y pensar siempre que su nieto es el mejor. Y a María por su cariño y por aguantarme.

A mis padres, muchísimas gracias por vuestro apoyo constante, por vuestra paciencia, y por ayudarme siempre que lo he necesitado. Y gracias también a José e Inés, por vuestro cariño.

Y mil gracias a Yoli, por estar ahí siempre, por hacerme reír, por tu apoyo incondicional, por todo lo bueno que hemos pasado durante todos estos años, sobre todo este último, y por el futuro que nos espera juntos.

La realización de esta Tesis Doctoral ha estado financiada por una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación.



## RESUMEN

El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) es una glicoproteína secretada multifuncional que presenta una potente actividad antitumoral basada en su acción dual sobre la vasculatura tumoral (efectos antiangiogénicos) y sobre las células tumorales (efectos antitumorales directos). Resultados previos del laboratorio mostraron que la sobre-expresión de PEDF es capaz de restringir la colonización de diversos órganos, como pulmón e hígado, en modelos experimentales de metástasis de melanoma en ratón.

En este trabajo mostramos que PEDF se secreta a niveles elevados por los melanocitos de la piel, y que su expresión se pierde durante la progresión maligna del melanoma. PEDF se expresa en líneas celulares establecidas a partir de biopsias de melanomas clasificados según criterios histopatológicos en la fase radial o vertical, a niveles similares a los encontrados en melanocitos. Sin embargo, su expresión se pierde en líneas celulares establecidas a partir de metástasis de melanoma. Mediante el análisis de estudios de expresión global en series amplias de líneas celulares de melanoma clasificadas por la combinación de criterios moleculares y funcionales en perfiles de expresión proliferativo e invasivo, encontramos que PEDF se expresa a niveles elevados en el cohorte de melanomas proliferativos, mientras que su expresión se pierde en el cohorte de melanomas invasivos. En una pareja de líneas celulares de melanoma establecidas a partir de la misma metástasis de un paciente de melanoma y que presentan características opuestas de agresividad, PEDF solamente se expresa en la línea celular poco agresiva. La expresión de PEDF es, además, heterogénea en biopsias procedentes de metástasis de melanoma cutáneas y en nódulos linfáticos. Estos resultados son consistentes con la reprogramación de la expresión de PEDF durante el proceso de metástasis del melanoma. El silenciamiento de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas aumenta su capacidad migratoria e invasiva y les confiere la capacidad de formar redes vasculogénicas. La adquisición de estas propiedades confiere a las células de melanoma en las que se ha anulado la expresión de PEDF una mayor agresividad, que se manifiesta en un aumento de su potencial metastático en modelos de colonización del pulmón y metástasis espontáneas en ratón. Además, demostramos que el silenciamiento de la expresión de PEDF en melanocitos primarios aumenta sus propiedades migratorias e invasivas y estimula su proliferación.

En consonancia con los resultados anteriores, los cambios en la expresión génica inducidos por la sobreexpresión de PEDF conducen a un perfil de expresión característico de células de melanoma menos agresivas. PEDF disminuye la expresión de múltiples genes implicados en el control del fenotipo angiogénico de las células de melanoma, así como de genes relevantes en el control de migración, invasión y agresividad del melanoma.

Nuestros resultados demuestran que PEDF controla aspectos básicos de la biología del melanocito y del melanoma, y que su pérdida permite a las células de melanoma adquirir un fenotipo más invasivo y agresivo, por lo que la modulación de la expresión de PEDF podría ser crítica para la progresión maligna de este tipo de cáncer.



## **ABSTRACT**

Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) is a multifunctional secreted glycoprotein with a potent anti-tumor activity based on its dual action on tumor vasculature (anti-angiogenic effects) and on tumor cells (direct anti-tumor effects). Previous results in our laboratory showed that PEDF over-expression restricts colonization of several organs, such as lung or liver, in experimental mouse models of metastasis.

In this study we show that PEDF is secreted at high levels by skin melanocytes, and that its expression is lost during malignant progression of melanoma. PEDF is expressed in cell lines isolated from melanoma biopsies classified according to histopathological criteria as radial growth phase or vertical growth phase, at levels similar to those of melanocytes. However, PEDF expression is lost in cell lines isolated from melanoma metastases. Using a high-throughput analysis of the data from microarray studies of molecular profiling of large series of human melanoma cell lines, classified by means of a combination of molecular and functional criteria into proliferative and invasive gene signatures; we found that PEDF is expressed at high levels in the proliferative melanomas cohort, whereas its expression is lost in the invasive melanomas cohort. Utilizing paired cell lines established from the same metastasis lesion from a melanoma patient but displaying opposite degree of aggressiveness, we found that PEDF is only expressed in the poorly aggressive cell line. PEDF expression is heterogeneous in biopsies of dermal and lymph node metastasis of melanoma. These results are consistent with the reprogramming of PEDF expression during the metastatic process of melanoma. PEDF silencing in poorly aggressive melanoma cell lines augments their migratory and invasive abilities and enables them to form vasculogenic networks. Acquisition of these properties confers a higher aggressiveness in PEDF-knocked-down melanoma cells, which translates into an augmented metastatic potential in the lung colonization and spontaneous metastasis mouse models. In addition, we demonstrate that PEDF silencing in primary melanocytes increases their migratory and invasive capabilities and stimulates their proliferation.

In agreement with the aforementioned results, changes in gene expression induced by PEDF over-expression lead to a gene expression profile typical of less aggressive melanoma cells. PEDF downregulates multiple genes involved in controlling the angiogenic phenotype of melanoma cells, as well as genes relevant to the control of melanoma migration, invasion and aggressiveness of melanoma cells.

Our results show that PEDF controls essential functional properties of melanocyte and melanoma biology, and that loss of its expression enables melanoma cells to acquire a more invasive and aggressive phenotype, therefore modulation of PEDF expression could be critical for the malignant progression of this cancer.



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO .....</b>	<b>7</b>
1.1. Efectos neurotróficos y neuroprotectores de PEDF .....	8
1.2. Efectos en el mantenimiento y expansión del nicho de células madre neurales de la zona subventricular del cerebro .....	9
1.3. Efectos antiangiogénicos de PEDF .....	9
1.4. PEDF y cáncer. Efectos antitumorales de PEDF .....	10
1.4.1. Efectos antitumorales indirectos .....	11
1.4.2. Efectos antitumorales directos .....	13
1.5. Receptores de PEDF .....	15
<b>2. MELANOMA .....</b>	<b>15</b>
2.1. Descripción histopatológica de la progresión maligna del melanoma cutáneo .....	16
2.2. Moléculas y vías de señalización implicadas en el desarrollo del melanoma .....	18
2.2.1. Genes implicados en el melanoma familiar .....	18
2.2.2. E-cadherina y N-cadherina .....	19
2.2.3. Rutas MAPK y PI(3)K .....	19
2.2.4. Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) .....	20
2.2.5. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina .....	21
2.3. Metástasis y angiogénesis en el melanoma .....	22
2.4. Clasificación molecular de los melanomas y nuevos modelos de progresión .....	24
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Cultivo celular .....</b>	<b>33</b>
1.1. Establecimiento de cultivos primarios de melanocitos .....	34
1.2. Establecimiento de cultivos primarios de células endoteliales microvasculares (HMVEC) .....	34
1.3. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos .....	35
<b>2. Plásmidos utilizados .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Generación de partículas lentivirales .....</b>	<b>38</b>
<b>4. Transducción de células mediante infección lentiviral .....</b>	<b>39</b>
<b>5. Transfección de células para la generación de líneas estables .....</b>	<b>39</b>
<b>6. Ensayo de transactivación de promotor .....</b>	<b>39</b>
<b>7. Extracción de proteínas, preparación de medios condicionados y <i>Western blot</i> .....</b>	<b>40</b>
7.1. Extracción de proteínas celulares totales .....	40
7.2. Fraccionamiento subcelular .....	40
7.3. Preparación de medios condicionados de cultivos celulares .....	40
7.4. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western Blot</i> .....	41
7.5. ELISA .....	41
<b>8. Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia .....</b>	<b>42</b>
8.1. Inmunohistoquímica en biopsias de melanoma .....	42
8.2. Inmunofluorescencia en secciones de tumores en ratón .....	43
8.3. Inmunofluorescencia en cultivos celulares .....	43
<b>9. Extracción de RNA total.....</b>	<b>44</b>
<b>10. RT-PCR cuantitativa .....</b>	<b>44</b>
<b>11. Análisis de expresión génica mediante <i>microarrays</i> de oligonucleótidos de genoma humano completo .....</b>	<b>45</b>

12. Análisis de datos de estudios de <i>microarrays</i> de melanoma disponibles en bases de datos públicas. ....	46
13. Ensayos de migración e invasión <i>in vitro</i> .....	48
14. Ensayo de crecimiento en agar blando.....	49
15. Ensayo de <i>vasculogenic mimicry in vitro</i> .....	49
16. Ensayo de viabilidad celular .....	49
17. Ensayo de proliferación celular mediante incorporación de EdU.....	49
18. Ensayos de metástasis en modelos experimentales en ratón .....	50
18.1. Ensayo de colonización del pulmón por inyección de células tumorales en la vena de la cola .....	50
18.2. Ensayo de formación de metástasis espontáneas a partir de un tumor primario subcutáneo.....	50
19. Análisis estadístico de los datos.....	51
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>1. PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO. IMPLICACIONES FUNCIONALES .....</b>	<b>55</b>
1.1. PEDF se produce a niveles elevados en los melanocitos de la piel .....	55
1.2. La expresión de PEDF se pierde en los melanomas muy invasivos .....	56
1.3. La expresión de PEDF se puede reprogramar durante la progresión maligna del melanoma humano.....	60
1.4. PEDF modula el potencial metastásico del melanoma mediante sus efectos directos en la capacidad migratoria e invasiva y en la plasticidad de las células de melanoma .....	64
1.5. La interferencia de PEDF aumenta la capacidad migratoria e invasiva y el potencial proliferativo de los melanocitos.....	72
1.6. La interferencia de PEDF no afecta a los niveles de expresión ni a la localización subcelular de E-cadherina, MITF y $\beta$ -catenina .....	74
1.6.1. E-cadherina.....	74
1.6.2. MITF .....	75
1.6.3. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina .....	78
<b>2. GENES REGULADOS POR PEDF EN LA LÍNEA CELULAR DE -MELANOMA HUMANO A375 .....</b>	<b>82</b>
2.1. Cambios en el perfil de expresión génica global inducidos por la sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma humano A375 .....	82
2.2. Regulación de la expresión de IL8, JAG1 y MLPH por PEDF en el melanoma A375 .....	88
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>91</b>
<b>1. Pérdida de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano. Implicaciones funcionales.....</b>	<b>93</b>
1.1. PEDF se expresa a niveles elevados en los melanocitos cutáneos: implicaciones funcionales en la biología del melanocito .....	93
1.2. Pérdida de la expresión de PEDF como huella de agresividad e invasividad en el melanoma .....	94
1.3. Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión de PEDF en la progresión metastásica del melanoma .....	97
1.4. Mecanismos reguladores de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma .....	100
<b>2. Genes regulados por PEDF en la línea celular de melanoma humano A375 .....</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>129</b>

## **ABREVIATURAS**





<b>Ang-2</b> : angiopoyetina 2	<b>min</b> : minutos
<b>bFGF</b> : factor de crecimiento de fibroblastos tipo básico	<b>MITF</b> : factor de transcripción asociado a microftalmia
<b>bHLH</b> : factores tipo básico hélice-lazo-hélice	<b>miR-30</b> : microRNA-30
<b>BRAF</b> : homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf	<b>MLPH</b> : melanofilina
<b>BSA</b> : albúmina de suero bovino	<b>MOI</b> : multiplicidad de infección
<b>CDKN2A</b> : inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas 2A	<b>MMP</b> : metaloproteasa de matriz
<b>CDK4</b> : quinasa dependiente de ciclinas 4	<b>mRNA</b> : RNA mensajero
<b>CMV</b> : citomegalovirus	<b>MTT</b> : bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>COL4A2</b> : colágeno tipo 4, alfa 2	<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b> : ortovanadato sódico
<b>C<sub>T</sub></b> : ciclo establecido como umbral de detección ( <i>threshold cycle</i> )	<b>NS</b> : lentivirus control con secuencia no interferente
<b>C-ter</b> : extremo carboxilo terminal	<b>N-ter</b> : extremo amino terminal
<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2-fenilindol	<b>NF-κB</b> : factor nuclear kappa-B
<b>DE</b> : desviación estándar	<b>NRAS</b> : homólogo en neuroblastoma del oncogen viral RAS
<b>DKK</b> : <i>Dickkopf</i>	<b>pb</b> : pares de bases
<b>DMEM</b> : medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	<b>PBS</b> : tampón fosfato salino
<b>dsRNA</b> : RNA de doble cadena	<b>PDGF</b> : factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>DTT</b> : ditioneitol	<b>PEDF</b> : factor derivado del epitelio pigmentario
<b>EdU</b> : 5-etinil-2-deoxiuridina	<b>PEDF<sub>e</sub></b> : proteína PEDF extracelular
<b>(E)GFP</b> : proteína fluorescente verde mejorada	<b>PEDF<sub>i</sub></b> : proteína PEDF intracelular
<b>ELISA</b> : ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	<b>PI(3)K</b> : fosfoinositol 3-OH-quinasa
<b>EPC-1</b> : <i>early population doubling cDNA-1</i>	<b>PLA<sub>2</sub></b> : fosfolipasa A2
<b>ERK</b> : quinasa regulada por señales extracelulares	<b>PMSF</b> : fluoruro de fenil metil sulfonilo
<b>FACS</b> : separación celular activada por fluorescencia	<b>PTEN</b> : homólogo de fosfatasa y tensina
<b>FBS</b> : suero fetal bovino	<b>PVDF</b> : fluoruro de polivinilideno
<b>FGF13</b> : factor de crecimiento de fibroblastos 13	<b>RAB27A</b> : Rab27A
<b>c-FLIP</b> : proteína inhibitoria similar a FLICE	<b>RCL</b> : <i>reactive-center loop</i>
<b>FN1</b> : fibronectina 1	<b>RGP</b> : melanoma en fase de crecimiento radial
<b>GAPDH</b> : gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>RNAi</b> : RNA de interferencia
<b>GEO</b> : <i>Gene Expression Omnibus</i>	<b>RPE</b> : célula del epitelio pigmentario de la retina
<b>GSK-3β</b> : glicógeno sintasa quinasa 3-β	<b>rpm</b> : revoluciones por minuto
<b>h</b> : horas	<b>RPMI-1640</b> : medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
<b>H&amp;E</b> : hematoxilina y eosina	<b>SDS</b> : dodecil sulfato sódico
<b>HFF</b> : fibroblastos humanos de la dermis	<b>SERPINF1</b> : inhibidor de serin-proteasas, miembro F1 (PEDF)
<b>HMGS</b> : suplemento de crecimiento de melanocitos humanos	<b>SERPINB5</b> : inhibidor de serin-proteasas, miembro B5 (maspina)
<b>HMVEC</b> : células endoteliales humanas de los microvasos	<b>shRNA<sup>mir</sup></b> : híbrido entre un <i>short-hairpin</i> RNA y parte del microRNA-30 (miR-30)
<b>IF</b> : inmunofluorescencia	<b>shPEDF</b> : lentivirus con secuencia de interferencia específica de PEDF
<b>IGFBP3</b> : proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 3	<b>TBS</b> : tampón tris salino
<b>IHC</b> : inmunohistoquímica	<b>TGFA</b> : factor de crecimiento transformante alfa
<b>IL8</b> : interleuquina 8	<b>TGFβ</b> : factor de crecimiento transformante beta
<b>INHBA</b> : inhibina beta A	<b>TNFα</b> : factor de necrosis tumoral alfa
<b>IRES</b> : sitio interno de entrada de ribosomas	<b>TSP-1</b> : trombospodina 1
<b>JAG1</b> : <i>jagged</i> 1	<b>TU/ml</b> : unidades de transducción/ml
<b>LGALS3</b> : galectina 3	<b>TYR</b> : tirosinasa
<b>LTR</b> : repeticiones terminales largas	<b>UV</b> : ultravioleta
<b>M254</b> : medio 254	<b>VGP</b> : melanoma en fase de crecimiento vertical
<b>MAPK</b> : proteínas quinasas activadas por mitógenos	<b>VEGF</b> : factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>MART-1</b> : antígeno de melanoma reconocido por células T, 1 (MLANA)	<b>VM</b> : <i>vasculogenic mimicry</i>
<b>MC</b> : medio condicionado	<b>VSVg</b> : envuelta glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular
<b>MC1R</b> : receptor de la hormona estimuladora de melanocitos	<b>WB</b> : <i>Western blot</i>



## INTRODUCCIÓN



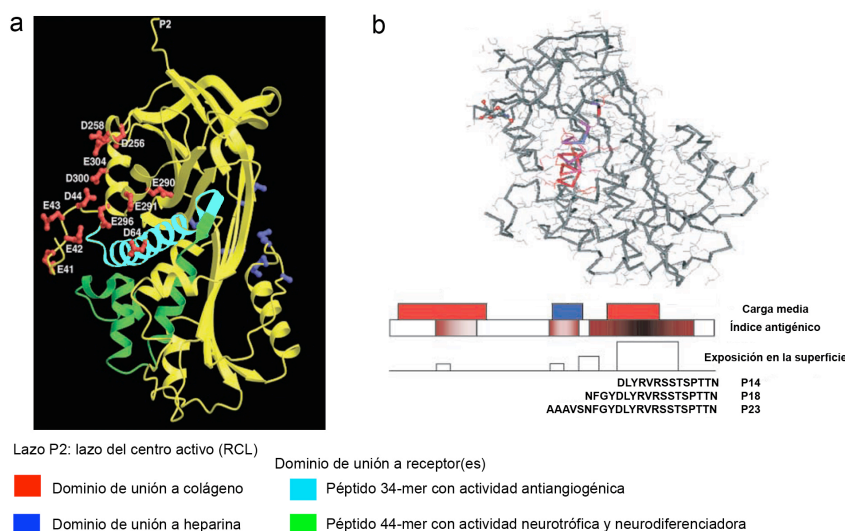
## 1. FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO

El factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) es una glicoproteína secretada de 50 kDa perteneciente a la familia de los inhibidores de las serin-proteasas (serpinas), aunque carece de actividad inhibidora (Barnstable and Tombran-Tink, 2004; Becerra *et al.*, 1995). Inicialmente fue aislado del medio condicionado de células en cultivo del epitelio pigmentario de la retina (RPE) fetal humana, y se identificó como un factor neurotrófico con potentes efectos neurodiferenciadores (Tombran-Tink and Barnstable, 2003). También se le conoce como EPC-1 (del inglés *early population doubling cDNA-1*), ya que se observó que su expresión se perdía en las sucesivas divisiones celulares en cultivos primarios de fibroblastos (Pignolo *et al.*, 1993). Posteriormente, se ha ido describiendo que PEDF se expresa en multitud de tipos celulares fetales y adultos, como hígado, ovarios, próstata, ojo, corazón, colon y cerebro, entre otros (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009).

El gen humano de *PEDF* (*SERPINF1*) tiene un tamaño de 16 Kb y está dividido en 8 exones y 7 intrones, así como una región 5' flanqueante inusual por presentar una alta densidad de repeticiones Alu (Tombran-Tink *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2006). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma humano 17p13.1, y está altamente conservado en vertebrados superiores (Tombran-Tink *et al.*, 2005).

*SERPINF1* codifica una proteína de 418 aminoácidos con una señal hidrofóbica, característica de proteínas secretadas, y un peso molecular calculado de 46,3 kDa (Steele *et al.*, 1993). Simonovic y colaboradores determinaron la estructura cristalina de PEDF a partir de la proteína recombinante humana, lo que ha permitido ir conociendo y delimitando las distintas regiones de esta molécula (Simonovic *et al.*, 2001). PEDF presenta un dominio llamado lazo del centro reactivo (RCL, *reactive-center loop*), característico de las serpinas, aunque, como ya se ha comentado, sin actividad inhibidora. Además, uno de los dominios de PEDF presenta una cadena lateral de carbohidratos que aumenta su tamaño molecular aparente al doblete de 50 kDa que se observa en geles de poliacrilamida (Tombran-Tink and Barnstable, 2003). Asimismo, se ha descrito la existencia de un dominio de unión a colágeno y otro de unión a heparina, así como un dominio de unión a receptores putativos (Figura 1a) (Meyer *et al.*, 2002; Simonovic *et al.*, 2001; Tombran-Tink *et al.*, 2005).

Por otra parte, se han identificado regiones muy conservadas tanto en el extremo C-terminal (C-ter) como en el N-terminal (N-ter), especialmente el N-ter 40-67 y el C-ter 277-301, que aparecen únicamente en PEDF pero no en otros miembros de la familia de las serpinas, lo que sugiere su implicación en algunas de las funciones específicas de PEDF (Tombran-Tink *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Por último, también se ha identificado una secuencia putativa de localización nuclear (residuos 141-151) (Tombran-Tink *et al.*, 2005), lo que sugiere que PEDF podría translocarse al núcleo y participar en la regulación del ciclo celular, función descrita inicialmente en fibroblastos humanos (Pignolo *et al.*, 1993).



**Figura 1. Estructura tridimensional de PEDF.** (a) Diagrama de cintas de PEDF basado en su estructura cristalina. Se indica el lazo del centro activo (RCL), y los dominios de unión a colágeno, de unión a heparina, y el de unión a receptores, que contiene los péptidos 34-mer y 44-mer (Adaptado de (Meyer *et al.*, 2002)). (b) Se resalta en rojo y azul sobre la estructura cristalina de PEDF parte de la región que comprende el péptido 34-mer (arriba) y se indica la posición y secuencia de los fragmentos P14, P18 y P23 derivados del 34-mer (abajo), así como su carga media (rojo, positiva; azul, negativa), la probabilidad de exposición en la superficie de la molécula y su índice antigénico (Adaptado de (Mirochnik *et al.*, 2009)).

Numerosos estudios en los últimos años han puesto de manifiesto el carácter multifuncional de PEDF, ya que no sólo muestra la actividad neurotrófica y neurodiferenciadora descritas inicialmente, sino que PEDF también es uno de los más potentes inhibidores de angiogénesis endógenos. PEDF posee una potente actividad antitumoral y antimetastásica (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009) y, adicionalmente, se le ha implicado en la protección frente al estrés oxidativo (Ek *et al.*, 2006), así como en el mantenimiento y expansión del nicho de células madre neurales en la zona subventricular del cerebro (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006).

### 1.1. Efectos neurotróficos y neuroprotectores de PEDF

La caracterización inicial de PEDF puso de manifiesto su capacidad para inducir la diferenciación de células de retinoblastoma Y79 (Tombran-Tink *et al.*, 1991). Adicionalmente, se describió que PEDF induce la diferenciación de células de neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001) y de neuronas de médula espinal en cultivo (Houenou *et al.*, 1999), así como de células inmaduras del epitelio pigmentario de la retina (Malchiodi-Albedi *et al.*, 1998).

PEDF promueve la supervivencia de las neuronas del cerebro, ojo y médula espinal frente a una amplia variedad de insultos neurodegenerativos, como isquemia, excitotoxicidad por glutamato y estrés oxidativo, entre otros (Bilak *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 1999; DeCoster *et al.*, 1999; Houenou *et al.*, 1999). En estos procesos se ha implicado al factor nuclear kappa-B (NF-kB) como principal mediador intracelular de PEDF, ya que induce la expresión de genes antiapoptóticos y/o neurotróficos que participan en el control de la supervivencia, proliferación y muerte celulares (Barnstable and Tombran-Tink, 2004; Yabe *et al.*, 2001).

## **1.2. Efectos en el mantenimiento y expansión del nicho de células madre neurales de la zona subventricular del cerebro**

Las células madre adultas se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y por su estado indiferenciado y multipotente que les permite originar los distintos linajes celulares que componen el tejido donde se encuentran (Weissman, 2000). Se piensa que estas propiedades pueden estar controladas por señales de otros tipos celulares adyacentes más diferenciados y por componentes de la matriz extracelular, y que, en conjunto, definen el nicho de las células madre (Doetsch, 2003). En un estudio relevante, Ramírez-Castillejo y colaboradores han demostrado que varios componentes de la zona subventricular del cerebro murino, entre ellos células ependimarias y endoteliales, secretan PEDF, y que éste ayuda a mantener la capacidad de auto-renovación de las células madre neurales adultas, que no expresan PEDF (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006). En estas células madre, PEDF no actúa como un factor mitogénico, sino que sirve como una señal de activación que aumenta la probabilidad de que las células madre se auto-renueven en presencia de otros factores de crecimiento (Pumiglia and Temple, 2006).

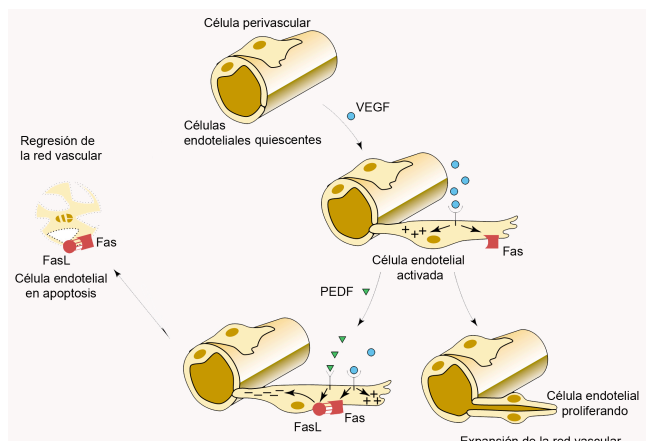
## **1.3. Efectos antiangiogénicos de PEDF**

La angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Carmeliet and Jain, 2000), es un proceso clave que sólo se activa durante el ciclo menstrual, en la placenta durante el embarazo y en respuesta a otros estímulos fisiológicos, como la reparación y cicatrización de heridas o el crecimiento del pelo. Sin embargo, existe un gran número de patologías asociadas a defectos en el control de la neovascularización, tales como cáncer, enfermedades oculares e inflamatorias, obesidad, asma, diabetes, cirrosis y esclerosis múltiple (Carmeliet, 2005).

En 1999 el grupo de N. Bouck publicó un estudio pionero en el que se identificó a PEDF como un potente inhibidor endógeno de la angiogénesis (Dawson *et al.*, 1999), y se describió su participación en el control de la vascularización de los diferentes compartimentos oculares (Bouck, 2002). Posteriormente se ha descrito que en los ratones deficientes para la expresión de PEDF la retina presenta un exceso de vasos sanguíneos (Doll *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008), pigmentación irregular, un número disminuido de células ganglionares y una densidad de microvasos aumentada. Otros órganos presentan, además, angiogénesis excesiva, como el riñón, el páncreas y la próstata (Doll *et al.*, 2003).

PEDF es uno de los inhibidores de angiogénesis naturales más potentes, siendo más activo que otros antiangiogénicos endógenos como la endostatina y la trombospondina 1 (TSP-1) (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009). El mecanismo de acción antiangiogénico de PEDF está mediado por su capacidad para inhibir la migración de las células endoteliales (Dawson *et al.*, 1999) y para inducir muerte por apoptosis en determinadas condiciones (Stellmach *et al.*, 2001). Esta inducción de apoptosis es selectiva, ya que PEDF, al igual que otros factores antiangiogénicos, destruye solamente los vasos activados que están en proceso de remodelación, pero no afecta a los vasos quiescentes (Bouck, 2002). La selectividad por el endotelio activado se debe a la inducción simultánea de la

expresión del receptor de muerte Fas en las células activadas por factores inductores de la angiogénesis como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y el aumento de la expresión del ligando de Fas (FasL) por el factor antiangiogénico (p.ej. PEDF o TSP-1), desencadenando la cascada de apoptosis (Figura 2) (Volpert *et al.*, 2002).



**Figura 2. Mecanismo de acción de PEDF en la inhibición selectiva de vasos en remodelación.** Cuando las células endoteliales de los microvasos son estimuladas por inductores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF), adquieren capacidad migratoria y proliferativa, expresan el receptor de muerte Fas en su membrana y proteínas antiapoptóticas intracelulares (+), y comienzan a formar nuevos vasos. El tratamiento con factores antiangiogénicos (PEDF en este caso) estimula la producción del ligando de Fas (FasL), que se une a su receptor Fas y se desencadena el programa de muerte celular en la célula endotelial y la posterior regresión de la red vascular (Adaptado de (Bouck, 2002)).

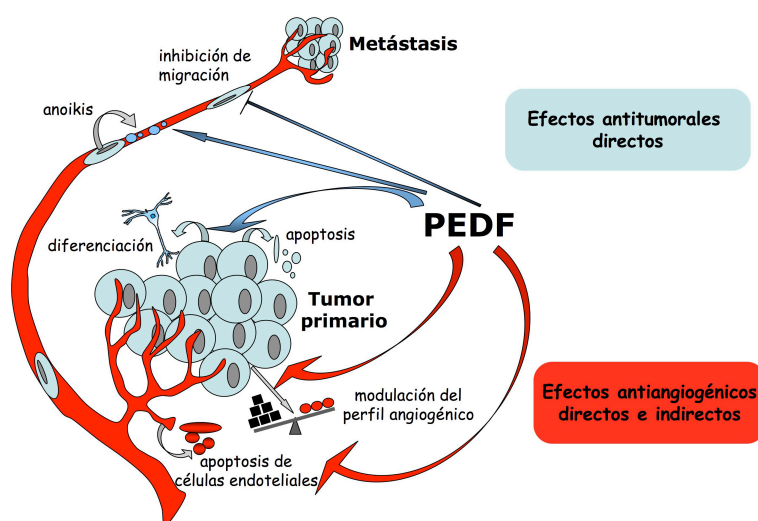
PEDF, al igual que otros inhibidores endógenos de la angiogénesis, ejerce un efecto inhibitor dominante sobre la acción de una gran variedad de inductores de angiogénesis (por ejemplo, VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos tipo básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)-BB, interleuquina 8 (IL8)) (Bouck, 2002; Dawson *et al.*, 1999). Ésta es una de las propiedades más interesantes de los factores antiangiogénicos endógenos en relación con el desarrollo de estrategias terapéuticas en cáncer, ya que a medida que el tumor progresa a estadios más malignos produce una mayor diversidad de factores inductores de la angiogénesis. Adicionalmente, la presión selectiva de terapias antiangiogénicas o terapias convencionales (quimioterapéuticos y radioterapia) promueve cambios en el repertorio de los factores inductores producidos por el tumor. Factores antiangiogénicos endógenos como el PEDF anularían la capacidad inductora de los diferentes factores proangiogénicos que el tumor fuera capaz de producir y permitirían, en principio, evitar la aparición de resistencia a la terapia antiangiogénica, que es actualmente una de las mayores limitaciones encontradas del uso de estrategias antiangiogénicas basadas en el bloqueo de factores inductores como el VEGF. De esta forma, los factores antiangiogénicos endógenos poseen características muy interesantes de cara al diseño de nuevas estrategias antiangiogénicas en cáncer.

#### 1.4. PEDF y cáncer. Efectos antitumorales de PEDF

El descubrimiento del potente efecto antiangiogénico de PEDF abrió la posibilidad de la aplicación terapéutica de este factor en multitud de patologías donde ocurre una neovascularización excesiva y aberrante. Inicialmente se analizó el potencial terapéutico de PEDF en patologías oculares que cursan con angiogénesis excesiva, como la degeneración de la mácula asociada a la edad y la retinopatía diabética (Bouck, 2002). Posteriormente, numerosos estudios han evaluado la relevancia de



PEDF en cáncer y su posible aplicabilidad al desarrollo de nuevas terapias antiangiogénicas en cáncer. PEDF posee una potente actividad antitumoral en modelos experimentales de diversos tipos de cáncer (Fernández-García *et al.*, 2007). En particular, nuestro laboratorio ha contribuido a dilucidar aspectos relevantes del mecanismo de acción antitumoral de PEDF en melanoma (García *et al.*, 2004). El efecto antitumoral de PEDF se basa en su acción dual sobre las células endoteliales y tumorales, y es, en consecuencia, la suma de efectos antitumorales indirectos (acciones sobre las células endoteliales o efecto antiangiogénico) y efectos antitumorales directos (diversas acciones sobre las propias células tumorales) (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009). En la Figura 3 se resumen estos efectos antitumorales directos e indirectos de PEDF.



**Figura 3. Mecanismo de acción antitumoral de PEDF.** La potente actividad antitumoral de PEDF se basa en una acción doble sobre las células tumorales y las células endoteliales. Las propiedades antiangiogénicas son consecuencia de la inducción de apoptosis en las células endoteliales activadas (efecto antiangiogénico directo) y la modulación de la producción de factores angiogénicos por las células tumorales (efecto antiangiogénico indirecto). Los efectos antitumorales directos incluyen la inducción de diferenciación, inhibición de migración e inducción de apoptosis en las células tumorales. La inhibición del potencial metastásico está basada en

la inhibición de la angiogénesis y en la inhibición directa de las capacidades migratorias e invasivas de las células tumorales, así como en la inducción de *anoikis* en las células tumorales en tránsito hacia nuevos focos metastásicos (Adaptado de (Fernández-García *et al.*, 2007)).

#### 1.4.1. Efectos antitumorales indirectos

PEDF contribuye a restringir la neovascularización en tejidos normales; por ello, la pérdida de su expresión durante la progresión maligna del cáncer podría contribuir al desarrollo de una vascularización tumoral aberrante, mientras que la sobreexpresión de este factor restringiría la capacidad de vascularización de los tumores. En este sentido, varios estudios en los que se sobreexpresó PEDF en líneas celulares de adenocarcinoma pancreático (Hase *et al.*, 2005) y de melanoma (Abe *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004) mostraron una reducción en la densidad de microvasos tumorales que se traducía en un efecto antitumoral significativo. Además, sólo los vasos en remodelación se veían afectados por la acción antiangiogénica de PEDF. Esta destrucción selectiva de los vasos tumorales está mediada por la capacidad de PEDF de activar la vía Fas/FasL en las células endoteliales activadas que se encuentran en los vasos en remodelación y expansión en el tumor. A este mecanismo se suma el efecto inhibitorio de PEDF sobre c-FLIP (proteína inhibitoria similar a FLICE), un dominante negativo endógeno de la proteína proapoptótica caspasa 8 (Zaichuk *et al.*, 2004).

Además de esta acción antiangiogénica directa, PEDF ejerce una acción antiangiogénica indirecta mediante la modulación de la capacidad de las células tumorales de producir factores que estimulan la angiogénesis. La vascularización de los tumores está determinada por una inversión del balance angiogénico (balance de factores inductores e inhibidores producidos por las células): en las células normales el balance está inclinado hacia el predominio de los factores inhibidores, que restringen la vascularización en el tejido sano; mientras que en las células tumorales este balance se invierte hacia el predominio de los factores inductores como consecuencia de la acumulación de alteraciones en oncogenes y genes supresores, y la hipoxia generada en el tumor (Jiménez and Volpert, 2001). Esta acción de PEDF sobre el balance angiogénico de las células tumorales es muy significativa, ya que las células tumorales producen la gran mayoría de los factores inductores de la angiogénesis presentes en el microentorno tumoral. PEDF normaliza el balance angiogénico de las células tumorales mediante diversas acciones: disminuye la expresión del potente factor inductor VEGF (García *et al.*, 2004; Takenaka *et al.*, 2005) y de metaloproteasas de matriz (MMP) relevantes para la angiogénesis, como MMP-2 y MMP-9 (Filleur *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2004); y aumenta la expresión del factor antiangiogénico TSP-1 (Guan *et al.*, 2004) y de la angiopoyetina 2 (ang-2) (García *et al.*, 2004). El aumento de la expresión de ang-2 por PEDF es especialmente relevante, ya que ang-2 es un factor iniciador de la angiogénesis. Las interacciones entre las células endoteliales y los pericitos determinan el estado de maduración y reposo de la vasculatura; por lo que el inicio de la angiogénesis requiere como etapa inicial obligatoria la desestabilización de estas interacciones por acción de la ang-2. Además, VEGF es un factor de supervivencia estrictamente requerido por las células endoteliales en vasos en remodelación bajo la influencia de niveles elevados de ang-2. En consecuencia, niveles elevados de ang-2 en ausencia de VEGF conducen a la muerte por apoptosis de las células endoteliales y a la regresión vascular (Carmeliet, 2000). De esta forma, la acción de PEDF inhibiendo la producción de VEGF y aumentando la producción de ang-2 por las células tumorales favorecerá la regresión de la vasculatura del tumor.

Adicionalmente, se han observado efectos angiogénicos antitumorales en neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001), adenocarcinoma de próstata (Halin *et al.*, 2004), glioblastoma (Guan *et al.*, 2003), carcinoma hepatocelular (Matsumoto *et al.*, 2004) y tumores de Wilm (Abramson *et al.*, 2003), entre otros.

La inhibición de la vasculatura tumoral por PEDF podría explicar por sí sola los efectos de PEDF sobre el crecimiento tumoral y la formación de metástasis. Sin embargo, PEDF también actúa directamente sobre las propias células tumorales, como se describirá en el siguiente apartado (Fernández-García *et al.*, 2007). El hecho de que PEDF no sea exclusivamente un factor antiangiogénico, sino que además ejerza diversas acciones directas en las células tumorales, podría explicar los potentes efectos antitumorales de PEDF en modelos experimentales, superiores a los descritos previamente para otros factores antiangiogénicos endógenos cuya acción se restringe a la vasculatura tumoral.

#### 1.4.2. Efectos antitumorales directos

En tumores de origen neuronal, PEDF promueve la diferenciación de estas células, lo que podría explicar la reducción del fenotipo maligno, como se ha observado en retinoblastoma (Tombran-Tink *et al.*, 1991) y neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001). También se ha descrito la capacidad de PEDF para inducir diferenciación neuroendocrina en líneas celulares y tumores de cáncer de próstata (Filleur *et al.*, 2005). En cuanto al mecanismo molecular que subyace a la acción prodiferenciadora de PEDF, se ha sugerido la implicación de NF- $\kappa$ B (Fernández-García *et al.*, 2007), así como la del receptor de 80 kDa de PEDF (ver apartado 1.5). El estado de fosforilación de PEDF es un mecanismo adicional que podría estar determinando su función biológica (Ek *et al.*, 2006), dado que se ha observado que la fosforilación de los residuos 24 y 114 por la caseína quinasa 2 reduce su actividad neurotrófica y aumenta su actividad antiangiogénica, mientras que la fosforilación del residuo 227 por la proteína quinasa A reduce ligeramente su actividad antiangiogénica (Maik-Rachline and Seger, 2006; Maik-Rachline *et al.*, 2005).

Por otro lado, en varios estudios se ha mostrado que PEDF induce apoptosis en líneas celulares de carcinoma de próstata (Doll *et al.*, 2003), glioma (Guan *et al.*, 2004), osteosarcoma (Takenaka *et al.*, 2005) y melanoma (Abe *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004). PEDF sensibiliza directamente a las células tumorales a la apoptosis inducida por diferentes condiciones de estrés celular, como la hipoxia, ausencia de mitógenos, ausencia de anclaje, etc. (Fernández-García *et al.*, 2007). Se ha sugerido, al igual que ocurre en las células endoteliales, la participación de la ruta Fas/FasL en la inducción de apoptosis por PEDF, de forma que las células tumorales que expresan Fas serían susceptibles de morir por apoptosis a través del aumento de la expresión de FasL por PEDF (Abe *et al.*, 2004; Takenaka *et al.*, 2005). PEDF también inhibe la proliferación de diversos tipos de células tumorales, disminuyendo el número de células que entran en fase S y aumentando el número de células en fase G<sub>0</sub> (Ek *et al.*, 2006; Hjelmeland *et al.*, 1999).

Finalmente, entre los efectos directos de PEDF sobre las células tumorales también se encuentra la inhibición de migración e invasión, que se ha observado en células de melanoma, glioma y otras (García *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2003). En cáncer de colon se ha descrito la unión de PEDF a colágeno I y III, por lo que se ha propuesto que PEDF inhibiría la migración a través de su competición con las integrinas por la unión a éstos y otros componentes de la matriz extracelular (Kozaki *et al.*, 1998). También se ha planteado este mecanismo para la maspina en la inhibición de migración e invasión de células de adenocarcinoma de mama (Blacque and Worrall, 2002). Maspina (*SERPINB5*) es un miembro de la familia serpina que, al igual que PEDF, carece de actividad inhibidora de serin-proteasas, y presenta efectos antiangiogénicos, antitumorales y antimetastásicos (Bailey *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 1994). Además, PEDF podría estar modulando la migración mediante la regulación de la producción de diversos tipos de factores extracelulares. PEDF regula negativamente la producción de factores quimiotácticos y/o proinvasivos como VEGF, bFGF y

la metaloproteasa MMP-9 en células de glioma (Guan *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007), y de VEGF en osteosarcoma (Takenaka *et al.*, 2005) y melanoma (García *et al.*, 2004).

Por tanto, PEDF podría estar restringiendo el potencial metastásico de las células tumorales no sólo destruyendo de forma directa la red vascular del tumor, lo que impide la diseminación metastásica de las células del tumor primario, sino también mediante la inhibición directa de la capacidad migratoria e invasiva de las propias células tumorales y mediante la modulación de su potencial angiogénico (Fernández-García *et al.*, 2007). En este sentido, la sobreexpresión de PEDF en células de melanoma (García *et al.*, 2004) y en células de adenocarcinoma de colon (Mahtabifard *et al.*, 2003) provoca una reducción drástica en la formación de metástasis en modelos de xenotransplante en ratón. Adicionalmente, PEDF disminuye la supervivencia de células de melanoma cuando éstas se encuentran en suspensión sin unión al sustrato (inducción de *anoikis*), lo que podría afectar drásticamente a la viabilidad de las células tumorales que se encuentran en circulación en tránsito hacia el órgano diana durante el proceso de metástasis (García *et al.*, 2004).

Todas estas observaciones apoyan el potencial terapéutico de PEDF en cáncer, ya que su naturaleza multifuncional permite limitar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, así como la vía de diseminación de las células tumorales y, adicionalmente, restringir la capacidad migratoria, invasiva y de supervivencia de las células tumorales. La suma de estas acciones múltiples de PEDF en las células endoteliales y tumorales conduce a efectos muy significativos de reducción del crecimiento tumoral y de la formación de metástasis.

La relevancia de PEDF en la progresión tumoral se ha puesto de manifiesto en los estudios en los que se ha analizado la expresión de este factor en la progresión maligna en diferentes tipos de cáncer (Fernández-García *et al.*, 2007). Se ha observado una correlación inversa entre los niveles de PEDF y el estadio y el potencial metastásico en adenocarcinoma de próstata (Halin *et al.*, 2004; Qingyi *et al.*, 2009), cáncer de páncreas (Uehara *et al.*, 2004), neuroblastoma (Crawford *et al.*, 2001), glioblastoma (Guan *et al.*, 2003), carcinoma hepatocelular (Matsumoto *et al.*, 2004), tumores de Wilm (Abramson *et al.*, 2003) y adenocarcinoma de mama (Cai *et al.*, 2006).

En los últimos años se han ido definiendo los dominios estructurales responsables de las diversas actividades biológicas de PEDF (Figura 1). Así, la región comprendida entre los residuos 58-101 del extremo N-terminal de PEDF, llamada péptido 44-mer, reproduce la función neurotrófica de la molécula completa en varios tipos celulares neuronales (Bilak *et al.*, 2002), inhibe la permeabilidad vascular inducida por VEGF (Liu *et al.*, 2004) e induce la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata (Filleur *et al.*, 2005). En cambio, la región que comprende los residuos 24-57 (llamada péptido 34-mer) es responsable de la actividad antiangiogénica (Filleur *et al.*, 2005). Recientemente se han delimitado regiones más pequeñas (P14, P18 y P23) dentro de este péptido (Figura 1b) que poseen actividad antiangiogénica *in vitro* (P14, P18, P23) e *in vivo* (P18). P18 presenta, además, actividad antitumoral, mientras que, sorprendentemente, el péptido P14 induce angiogénesis *in vivo* (Mirochnik *et al.*, 2009).

### 1.5. Receptores de PEDF

La variedad de funciones, a veces antagónicas, que presenta PEDF en diferentes tipos celulares sugiere la existencia de distintos receptores que estarían mediando sus múltiples actividades. Diversos estudios han descrito la unión de PEDF a glucosaminoglucanos sulfatados (heparina y otros) (Alberdi *et al.*, 1998) y no sulfatados (hialuronano) (Becerra *et al.*, 2008), colágenos (Meyer *et al.*, 2002), así como a la superficie de células de retinoblastoma, neuronas del cerebelo granular (Alberdi *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2001), motoneuronas (Bilak *et al.*, 1999), células de cáncer de próstata y células endoteliales (Filleur *et al.*, 2005).

Mediante el uso de péptidos sintéticos derivados de PEDF se ha identificado un receptor de 80 kDa en las células de retinoblastoma Y79, en neuronas motoras y del cerebelo y en la retina neural (Alberdi *et al.*, 1999; Aymerich *et al.*, 2001). El péptido 44-mer es capaz de unirse a este receptor, y reproduce los efectos neurotróficos y pro diferenciadores de PEDF (Bilak *et al.*, 2002; Filleur *et al.*, 2005). En cambio, el péptido 34-mer no se une al receptor de 80 kDa, pero es capaz de bloquear angiogénesis e inducir apoptosis en las células tumorales, sugiriendo la existencia de, al menos, otro receptor que mediese la acción antiangiogénica de PEDF. Adicionalmente, se ha identificado la unión de PEDF a un receptor de 60 kDa en células endoteliales (Yamagishi *et al.*, 2004), lo que sugeriría que diferentes tipos celulares pueden expresar distintos receptores de PEDF.

Por otro lado, se ha encontrado un receptor para PEDF que posee actividad fosfolipasa A2 en la retina y en la superficie celular de células ARPE-19 (células RPE inmortalizadas) (Notari *et al.*, 2006), así como en tejido adiposo y, en menor medida, en próstata, testículos, útero, timo, piel y músculo esquelético (Filleur *et al.*, 2009). Este receptor, también conocido como proteína de secreción de transporte 2-2 (TTS-2.2); fosfolipasa A2 independiente (PLA<sub>2</sub>)<sub>ξ</sub>; desnutrina de ratón; o triglicérido lipasa adiposa; presenta un tamaño de aproximadamente 80 kDa, aunque se desconoce si se trata del receptor de 80 kDa descrito previamente. Su potente actividad fosfolipasa A2 libera ácidos grasos, por lo que se ha sugerido que, dependiendo del tipo de lípidos mediadores que se produjeran por su acción, este receptor podría mediar no sólo la actividad promotora de supervivencia y diferenciación de PEDF, sino también la antiangiogénica y antitumoral (Filleur *et al.*, 2009).

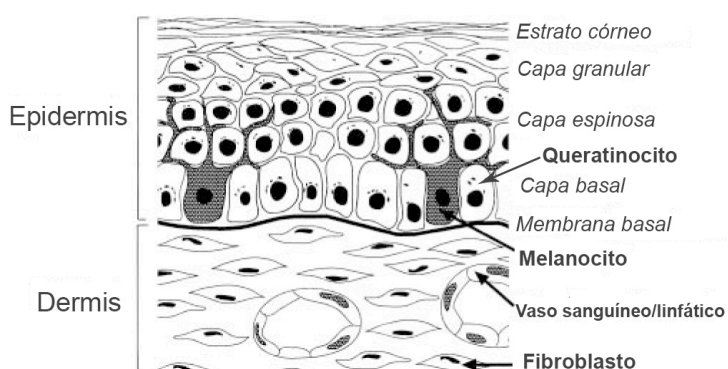
Por último, recientemente se ha mostrado que PEDF también se une al receptor de laminina de 67 kDa (Bernard *et al.*, 2009), y que éste media la actividad antiangiogénica de PEDF, por lo que se ha sugerido que el receptor de laminina podría ser el receptor de 60 kDa identificado en células endoteliales (Yamagishi *et al.*, 2004).

## 2. MELANOMA

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que, aunque sólo constituye el 4% de todos los cánceres dermatológicos, es responsable del 80% de las muertes por cáncer de piel (Miller and Mihm, 2006). La detección y resección quirúrgica temprana permite su curación en aproximadamente el 80%

de los casos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Sin embargo, el hecho de que se realice cuando el tumor esté muy avanzado, así como la especial resistencia del melanoma a todas las terapias actuales, hacen del melanoma uno de los cánceres más agresivos y letales, y para el que urge encontrar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces (Soengas and Lowe, 2003).

Las células normales a partir de las cuales se origina el melanoma son los melanocitos, localizados fundamentalmente en la piel y en los ojos, donde se especializan en la producción de melaninas, los pigmentos responsables del color de la piel, el pelo y los ojos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).



**Figura 4. Diagrama de la piel normal.** La epidermis tiene tres capas principales constituidas por queratinocitos: la capa basal, más cercana a la dermis; la capa espinosa; y la capa granular, por debajo del estrato córneo. Los melanocitos se encuentran sobre la membrana basal, y su estado proliferativo está estrechamente controlado por los queratinocitos, manteniéndose una proporción constante de 1:36 con respecto a los queratinocitos, constituyendo la unidad melanoepidérmica. Los melanocitos

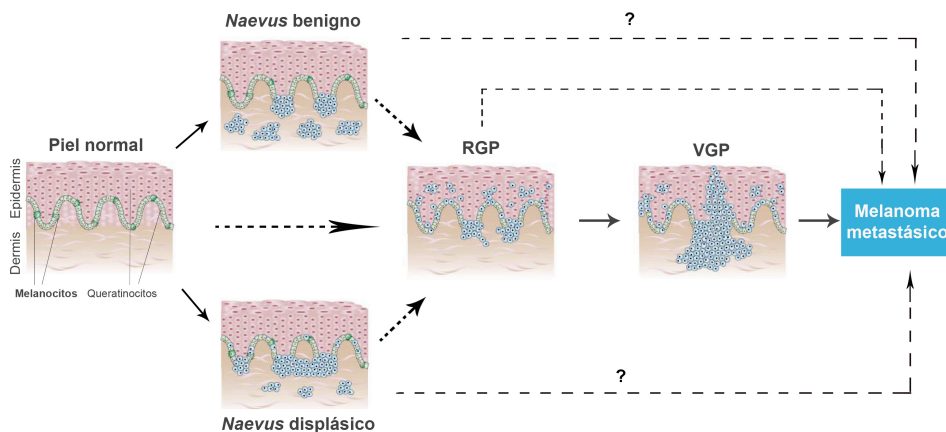
sintetizan y transfieren la melanina a través de sus múltiples dendritas a los queratinocitos. La dermis está compuesta por fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios embebidos en un denso tejido conectivo (Adaptado de (Hsu *et al.*, 2002))

Los melanocitos cutáneos se originan durante el desarrollo a partir de progenitores altamente motiles de la cresta neural; éstos dan lugar, entre otras células, a los melanoblastos, los precursores de los melanocitos, que migran y proliferan en su recorrido hacia la piel durante el desarrollo embrionario (Thomas and Erickson, 2008). En la piel, los melanocitos residen en la capa basal de la epidermis y en los folículos pilosos (Lin and Fisher, 2007), representan el 1-3% de las células de la piel, y su homeostasis está estrechamente regulada por los queratinocitos epidérmicos (Hsu *et al.* 2002; Slominski *et al.*, 2004) (Figura 4). Se ha llamado la unidad melanoepidérmica a la estrecha relación simbiótica entre un melanocito y aproximadamente 36 queratinocitos asociados (Fitzpatrick and Breathnach, 1963), siendo esta relación en la capa basal de la epidermis de 1:5. La relación entre el número de queratinocitos y melanocitos está estrechamente controlada y permanece estable a lo largo de toda la vida (Haass *et al.*, 2005). En respuesta a la radiación ultravioleta (UV), los queratinocitos secretan factores que regulan la supervivencia, diferenciación, proliferación y motilidad de los melanocitos, de tal manera que estimulan a los melanocitos para que sintetizen melanina y se la transfieran a los queratinocitos mediante los gránulos melanosomas, protegiendo la piel de los daños asociados a la radiación UV y previniendo el cáncer de piel (Lin and Fisher, 2007).

## 2.1. Descripción histopatológica de la progresión maligna del melanoma cutáneo

La observación clínica e histopatológica del melanoma cutáneo ha permitido la descripción del

desarrollo y progresión del melanoma a partir de la transformación maligna de los melanocitos mediante una serie de fases de acuerdo a la localización y estadio de la progresión (Figura 5): *naevus*, melanoma en fase de crecimiento radial (RGP), melanoma en fase de crecimiento vertical (VGP) y metástasis de melanoma (Clark, 1991).



**Figura 5. Descripción histopatológica de la progresión maligna del melanoma cutáneo.** Se muestra un esquema de la epidermis y la dermis de la piel normal, y se señalan los melanocitos y los queratinocitos. Una proliferación irregular de los melanocitos da lugar a un *naevus* (lunar), lesión generalmente benigna y que rara vez progresa a melanoma. El melanoma en fase de crecimiento radial (RGP) presenta una alta capacidad proliferativa, pero no tiene potencial metastásico. En cambio, el melanoma en fase de crecimiento vertical (VGP) sí presenta potencial metastásico, invade la capa superior de la epidermis y la dermis y es capaz de intravasarse y diseminarse a otros órganos, dando lugar a metástasis (Adaptado de (Chin, 2003)).

La transformación maligna del melanocito implica la adquisición de nuevas propiedades funcionales y cambios muy significativos en los mecanismos de control de aspectos funcionales básicos en la biología del melanocito. Las mutaciones en genes críticos en la regulación de la proliferación, la producción de factores de crecimiento autocrinos y la pérdida de receptores de adhesión contribuyen a una señalización intracelular aberrante en los melanocitos, permitiéndoles escapar de la estrecha regulación por los queratinocitos (Haass *et al.*, 2005). La proliferación incontrolada de los melanocitos conduce a la formación de un lunar o *naevus*. Los *naevi* son generalmente benignos y rara vez progresan a melanoma, en parte porque estos melanocitos se encuentran en un estado de parada del ciclo celular asociado a senescencia, pudiendo permanecer en esta situación durante décadas (Michaloglou *et al.*, 2005). Sin embargo, un crecimiento más aberrante de un *naevus* preexistente o como una nueva lesión puede dar lugar a un *naevus* displásico con melanocitos atípicos y mayor asimetría e irregularidad de la lesión, que puede regresar, quedar latente o progresar hacia un estadio más maligno (Miller and Mihm, 2006).

Un melanoma en fase de crecimiento radial (RGP) es una lesión que en el melanoma humano no procede, en general, de la malignización de un *naevus*, sino de la malignización de melanocitos de la capa basal de la epidermis. Los melanomas RGP se encuentran localizados fundamentalmente en la parte basal de la epidermis, proliferando horizontalmente, aunque estas células también pueden penetrar la dermis papilar, individualmente o en pequeños grupos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). A pesar de que

las células de lesiones RGP presentan una alta proliferación y una marcada desdiferenciación, no pueden o presentan una capacidad muy limitada de formar colonias cuando crecen *in vitro* en agar blando y tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos (Miller and Mihm, 2006).

La lesión RGP puede progresar a un melanoma en fase de crecimiento vertical (VGP), que es un estadio más peligroso en el que las células ya tienen potencial metastásico. Estas células VGP invaden verticalmente la capa superior de la epidermis y penetran en la dermis y el tejido subcutáneo a través de la membrana basal en forma de nódulos o grupos más dispersos (Chin, 2003; Gray-Schopfer *et al.*, 2007), desde donde se pueden intravasas a la circulación sanguínea o linfática y diseminarse a otros órganos, donde eventualmente pueden desarrollar metástasis.

Este modelo de progresión del melanoma está en consonancia con la hipótesis de la evolución clonal de los tumores (Nowell, 1976), que establece que el cáncer progresa de un estadio poco metastásico a uno muy metastásico a través de la acumulación de cambios moleculares (mutaciones y/o cambios epigenéticos) que aumentan el potencial proliferativo e invasivo de las células cancerosas, y que promoverían la progresión lineal entre los estadios RGP, VGP y metástasis. En apartados posteriores veremos que la progresión del melanoma no requiere obligatoriamente la transición lineal entre todos los estadios descritos (*naevi*, RGP, VGP y metástasis) (Miller and Mihm, 2006), por lo que han surgido modelos alternativos para explicar la progresión maligna y la metástasis en este tipo de cáncer.

## **2.2. Moléculas y vías de señalización implicadas en el desarrollo del melanoma**

La patogénesis del melanoma es debida tanto a factores genéticos como a factores de riesgo ambientales, y su incidencia se ve influida por la pigmentación de la piel, la localización geográfica, la exposición al sol y el número y tipo de lunares (Chin, 2003; Houghton and Polsky, 2002). A continuación se describen las moléculas y vías de señalización más importantes implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma.

### **2.2.1. Genes implicados en el melanoma familiar**

Está comúnmente aceptado que alrededor de un 10% de todos los casos de melanoma son familiares (Hayward, 2003). Se han identificado tres genes que predisponen a la aparición de melanoma: los genes de alta penetrancia inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas 2A (*CDKN2A*) y quinasas dependiente de ciclinas 4 (*CDK4*); y el gen de baja penetrancia receptor de la hormona estimuladora de melanocitos (*MC1R*), refiriéndose la penetrancia al porcentaje de individuos que, teniendo un genotipo determinado -en este caso, el gen mutado- expresan el fenotipo patológico asociado a ese genotipo (Griffiths *et al.*, 2000). El gen *CDKN2A* es el que aparece más frecuentemente mutado (20-40% de las familias con casos de melanoma (de Snoo *et al.*, 2007)). Codifica dos proteínas, p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, ambas supresores tumorales implicadas en vías críticas de la regulación del ciclo celular y el crecimiento y apoptosis (Lin and Fisher, 2007; Serrano *et al.*, 1993). *CDK4* también está



involucrado en el control del ciclo celular (Zuo *et al.*, 1996). MC1R está implicado en la regulación del balance de la producción de eumelanina marrón/negra y feomelanina amarilla/roja (Mountjoy *et al.*, 1992). En particular, las variantes asociadas con el cabello rojo, piel blanca, incapacidad para el bronceado y tendencia a las pecas; presentan una mayor cantidad de feomelanina en la piel y, en consecuencia, una disminución de la protección frente a la luz UV, por lo que los melanocitos con esas variantes de MC1R son más susceptibles a los efectos de daño en el DNA inducidos por la radiación UV (Scott *et al.*, 2002).

### 2.2.2. E-cadherina y N-cadherina

Uno de los eventos primarios clave en la progresión del melanoma es la pérdida de expresión de la proteína de membrana E-cadherina en los melanocitos, que disminuye la adhesión intercelular de éstos con los queratinocitos adyacentes y permite a los melanocitos independizarse de la restricción de su proliferación y motilidad (Guilford, 1999; Haass *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 1994). Hay múltiples mecanismos que conducen a la pérdida de E-cadherina, como mutaciones en el gen de *E-cadherina* o la inducción de los represores de E-cadherina Snail o Slug, entre otros (Ch'ng and Tan, 2009; Hsu *et al.*, 1996). Simultáneamente a la pérdida gradual de E-cadherina durante el desarrollo del melanoma aumenta la expresión de N-cadherina, que permite a los melanocitos transformados interactuar con otros tipos celulares presentes en el microentorno tumoral, como los fibroblastos y las células endoteliales del estroma tumoral (Haass *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 1996). El establecimiento de estas nuevas interacciones es crítico para la adquisición de otras propiedades características de las células de melanoma más agresivas como migración, invasividad y angiogénesis.

### 2.2.3. Rutas MAPK y PI(3)K

La ruta RAS/RAF/MEK/ERK o MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) es un regulador clave de la proliferación de los melanocitos y de células de melanoma, estando ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) hiperactivado en hasta un 90% de los melanomas humanos (Cohen *et al.*, 2002). Un mecanismo muy común en melanoma es la ganancia de función de *NRAS* (homólogo en neuroblastoma del oncogen viral RAS), que aparece mutado en un 15-20% de los melanomas (Chin, 2003). Sin embargo, el componente más frecuentemente mutado de esta ruta es *BRAF* (homólogo B1 del oncogen viral del sarcoma murino v-raf), que aparece alterado en el 50-70% de los melanomas, siendo la mutación más frecuente una sustitución de ácido glutámico por valina en la posición 600 (V600E) (Davies *et al.*, 2002). <sup>V600E</sup>BRAF estimula la señalización constitutiva de ERK, promoviendo la proliferación y supervivencia; asimismo, contribuye a la angiogénesis al inducir la secreción de VEGF (Sharma *et al.*, 2005).

Una observación sorprendente es que hasta el 80% de los *naevi* benignos tienen mutado *BRAF* (Pollock *et al.*, 2003) aunque, como ya se ha comentado, la mayoría de los *naevi* permanecen estáticos durante décadas, y sólo raramente progresan a melanoma (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Recientemente

se ha demostrado que BRAF o NRAS oncogénicos inducen la entrada en senescencia de los melanocitos de los *naevi* mediada por p16<sup>INK4A</sup> (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Michaloglou *et al.*, 2005). Consecuentemente, la progresión a melanoma requeriría la salida del estado de senescencia mediante la cooperación con otras lesiones oncogénicas como la amplificación de *MYC* (Zhuang *et al.*, 2008) o la pérdida de los supresores tumorales p16<sup>INK4A</sup> (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Papp *et al.*, 2003) o p53 (Bennett, 2003).

Otra ruta de señalización importante en melanoma es la vía de la PI(3)K (fosfoinositol 3-OH-quinasa), que regula la supervivencia, proliferación y motilidad celulares, así como la quimiorresistencia del melanoma (Cully *et al.*, 2006). Se han encontrado mutaciones en *PI(3)K* en un 3% de los melanomas metastásicos (Omholt *et al.*, 2006), y mutaciones de pérdida de función de *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) en un 5-20% de melanomas de estadio avanzado (Wu *et al.*, 2003). Asimismo, *AKT* se encuentra sobreexpresado en un 60% de los melanomas (Robertson, 2005; Stahl *et al.*, 2004).

#### 2.2.4. Factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF)

El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) pertenece a la familia bHLH (factores tipo básico hélice-lazo-hélice) y está considerado como el regulador central en la biología del melanocito, en parte porque regula la expresión de proteínas melanogénicas como tirosinasa (TYR), GP100 (homólogo de *silver*) y MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por células T, 1; MLANA) (Levy *et al.*, 2006). MITF participa en el control de la supervivencia de los melanoblastos (precursores de los melanocitos) y en la determinación del linaje melanocítico (Widlund and Fisher, 2003).

MITF juega un papel clave en el melanoma. En los últimos años han aparecido evidencias que sugieren que MITF es un oncogen específico de linaje en el melanoma humano (Garraway and Sellers, 2006), ya que se ha visto que puede cooperar con <sup>V600E</sup>BRAF en la transformación de melanocitos inmortalizados (Garraway *et al.*, 2005), aumentando la supervivencia y la proliferación. Se han encontrado amplificaciones del gen *MITF* en el 10-20% de melanomas, con una mayor incidencia entre los melanomas más avanzados (Garraway *et al.*, 2005). Además, se ha observado que la expresión sostenida de MITF es necesaria para la proliferación y supervivencia de las células de melanoma, ya que su pérdida sensibiliza a las células de melanoma a la acción de agentes quimioterapéuticos convencionales (Garraway *et al.*, 2005; Levy *et al.*, 2006). No obstante, en las células de melanoma los niveles de expresión de MITF suelen ser significativamente inferiores a los de los melanocitos (excepto en los casos en los que está amplificado), y la sobreexpresión de MITF reduce la capacidad tumorigénica de las células de melanoma (Selzer *et al.*, 2002), así como su proliferación, incluso en presencia de BRAF oncogénico (Wellbrock and Marais, 2005).

Sin embargo, la expresión de MITF es variable en biopsias y líneas celulares de melanoma. En algunos casos, los niveles de MITF son elevados (Garraway *et al.*, 2005), mientras que en otros son bajos o indetectables (Salti *et al.*, 2000; Selzer *et al.*, 2002; Vachtenheim *et al.*, 2001), lo que pone de

manifiesto que existen distintos grupos de melanomas con niveles muy diferentes de actividad biológica de MITF (Levy *et al.*, 2006).

Considerando estos antecedentes, se ha propuesto que las variaciones en los niveles y actividad de MITF determinan los efectos funcionales diferenciales mediados por este factor en las células de melanoma. Los niveles muy altos de MITF determinan la parada del ciclo celular y la diferenciación, presumiblemente a través del control de reguladores del ciclo celular (p16, CDK2 y p21); mientras que los niveles intermedios de MITF promueven la proliferación. En cambio, niveles bajos pero significativos de MITF promueven invasión, y niveles muy bajos de MITF provocan la parada del ciclo celular y apoptosis (Carreira *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

#### 2.2.5. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina

La ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina está implicada en diversos procesos celulares, como especificación del linaje celular, proliferación, migración y diferenciación, durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis adulta, y una señalización alterada o su activación constitutiva puede conducir al desarrollo del cáncer (Larue *et al.*, 2009). La proteína  $\beta$ -catenina es un componente central de esta vía, y presenta múltiples funciones dependiendo de su localización celular. En la inmensa mayoría de las células, entre ellas los melanocitos, la  $\beta$ -catenina se encuentra en membrana asociada con las cadherinas, implicadas en la adhesión célula-célula. En cambio, la  $\beta$ -catenina no asociada con cadherinas puede ser fosforilada por la glicógeno sintasa quinasa 3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) y, consecuentemente, ser ubiquitinada y degradada (Kimelman and Xu, 2006). Tras exposición a factores Wnt activadores (Wnt1, Wnt3), la GSK-3 $\beta$  es inhibida, permitiendo la estabilización y translocación al núcleo de la  $\beta$ -catenina, donde interacciona con factores LEF/TCF para regular la expresión de genes diana. Por otro lado, existen antagonistas endógenos de la vía que impiden la estabilización y posterior translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina, entre ellos algunos miembros de la familia *Dickkopf* (DKK), como DKK1 (Weeraratna, 2005).

Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel clave de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina en la biología de los melanocitos y el melanoma (O'Connell and Weeraratna, 2009). En los melanocitos, esta vía participa tanto en su diferenciación desde precursores de la cresta neural como en el control de la expresión de genes relacionados con la pigmentación y otros procesos, como *MITF*, *SOX10* o *TYR* (Weeraratna, 2005). Además, se ha sugerido su participación en la transformación maligna de los melanocitos, ya que mediante el uso de una forma de  $\beta$ -catenina estabilizada en el núcleo se ha observado que ésta promueve la immortalización de melanocitos primarios en cultivo evitando la senescencia mediante la represión de p16<sup>INK4A</sup>, y que su cooperación con NRAS oncogénico origina melanomas en modelos animales (Delmas *et al.*, 2007).

Existe cierta controversia en relación con la implicación de esta ruta en el desarrollo del melanoma. Por un lado, las mutaciones estabilizadoras de  $\beta$ -catenina son raras en melanoma (Rubinfeld

*et al.*, 1997). Además, hay estudios que sugieren que existiría una supresión de esta vía en la progresión del melanoma hacia metástasis (Demunter *et al.*, 2002), mientras que en otros se apunta a que su activación aberrante promovería la progresión tumoral, al menos en algunos melanomas (Murakami *et al.*, 2001; Rimm *et al.*, 1999). Además, también existe un cierto debate en cuanto a la posible correlación entre la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina y la agresividad del melanoma. Aunque se ha encontrado localización nuclear y/o citoplásmica de  $\beta$ -catenina en un 28% de los melanomas (Rimm *et al.*, 1999), parece que en la mayoría de los melanomas la  $\beta$ -catenina se encontraría en la membrana (Pecina-Slaus *et al.*, 2007; Rimm *et al.*, 1999), asociándose la localización nuclear de la  $\beta$ -catenina con buen pronóstico en melanoma (Bachmann *et al.*, 2005; Kageshita *et al.*, 2001; Pecina-Slaus *et al.*, 2007).

En los últimos años han aparecido evidencias que implican a un factor de la familia Wnt, Wnt5a, en la invasión del melanoma (Bittner *et al.*, 2000; Weeraratna *et al.*, 2002), presumiblemente a través de la activación de la proteína quinasa C y de la reorganización del citoesqueleto, así como de la regulación de genes asociados con la transición epitelio-mesénquima, como *SNAIL* y *E-cadherina* (Dissanayake *et al.*, 2007).

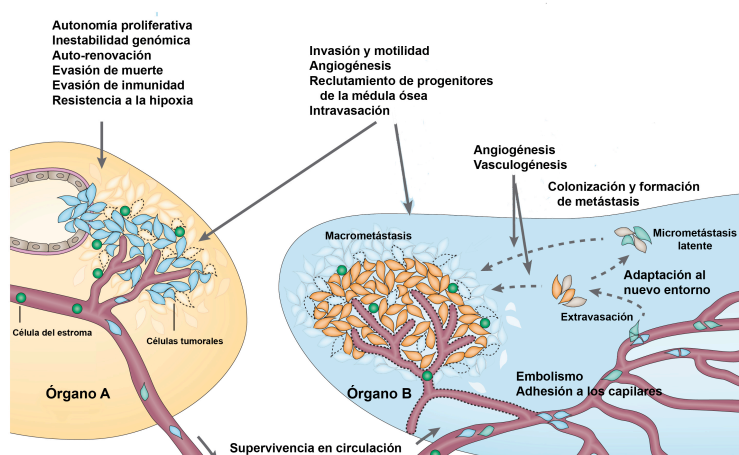
### 2.3. Metástasis y angiogénesis en el melanoma

El proceso de metástasis se puede describir como una serie de etapas discretas necesarias para que las células malignas se diseminen desde el tumor de origen y lleguen a colonizar órganos distantes (Nguyen *et al.*, 2009). Esta sucesión de etapas incluye de forma secuencial la invasión local del tejido circundante, la intravasación, la supervivencia en el torrente circulatorio, la extravasación y, finalmente, la colonización de un nuevo órgano (Chambers *et al.*, 2002; Fidler, 2003). Una vez colonizado un tejido distante, las células malignas que sobreviven en ese nuevo microambiente pueden proliferar activamente para formar una macrometástasis, o quedar latentes durante años en forma de micrometástasis y eventualmente activarse y formar un nuevo foco tumoral, a partir del cual se pueden diseminar de nuevo células malignas hacia otros órganos. La activación de la vasculogénesis y la angiogénesis son estrictamente necesarias para que ocurra la transición de micrometástasis a macrometástasis (Figura 6) (Gao *et al.*, 2008; Holmgren *et al.*, 1995).

Hace años se consideraba que la metástasis ocurría únicamente como consecuencia de la adquisición gradual y acumulativa de alteraciones en el tumor primario (evolución clonal) que conducía a células con una mayor malignidad y propensión a diseminarse y colonizar otros órganos. Actualmente se están proponiendo nuevos modelos para explicar el proceso de metástasis, y que intentan integrar la evolución clonal y la heterogeneidad de los tumores primarios con la existencia de propiedades metastásicas en estadios muy tempranos de la progresión (Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen and Massague, 2007).

En la progresión tumoral es fundamental la angiogénesis, tanto para el crecimiento del tumor primario y la posterior diseminación de las células tumorales vía sanguínea, como para el desarrollo

posterior de los nuevos focos metastásicos en órganos distantes (Hanahan and Folkman, 1996; Hanahan and Weinberg, 2000). Numerosos estudios han mostrado que los melanomas presentan actividad angiogénica (Streit and Detmar 2003). Las células de melanoma producen distintos reguladores positivos de la angiogénesis, como VEGF (Erhard *et al.*, 1997; Marcoval *et al.*, 1997), bFGF (Reed *et al.*, 1994), IL8 (Nurnberg *et al.*, 1999), factor de crecimiento de la placenta (Lacal *et al.*, 2000), PDGF (Barnhill *et al.*, 1996), angiogenina (Hartmann *et al.*, 1999) y MMP-1 y MMP-9 (Mahabeleshwar and Byzova, 2007). Asimismo, utilizando modelos animales experimentales se ha visto que la expresión de estos factores en las células de melanoma aumenta el crecimiento y angiogénesis tumorales y el potencial metastásico (Mahabeleshwar and Byzova, 2007; Streit and Detmar, 2003).



**Figura 6. Metástasis.** Esquema representativo de las principales etapas del proceso de metástasis desde la generación del tumor primario (izquierda, órgano A) hasta la formación de tumores secundarios o metástasis en un órgano distante (derecha, órgano B). Se destacan algunas de las propiedades fundamentales que deben adquirir las células tumorales durante las diferentes etapas de la cascada metastásica (Adaptado de (Nguyen and Massague, 2007)).

Hace más de dos décadas J. Folkman propuso la inhibición de la angiogénesis tumoral como una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer (Folkman, 1975). En numerosos estudios con modelos experimentales de melanoma se ha demostrado que la inhibición de la angiogénesis tumoral mediante diversas estrategias, como anticuerpos bloqueantes de VEGF o bFGF, o la sobreexpresión de antiangiogénicos endógenos como endostatina o TSP-1, conducen a una inhibición de la angiogénesis tumoral y, en consecuencia, a una reducción del crecimiento y/o metástasis de melanoma (Streit and Detmar 2003). Sin embargo, y como ha pasado en otros tipos de cáncer, no se ha observado un beneficio significativo en la supervivencia de los pacientes con melanoma en los ensayos clínicos en los que se utilizó como monoterapia de bevacizumab (anticuerpo bloqueante contra VEGF) (Varker *et al.*, 2007) o ABT-510 (péptido análogo de TSP-1) (Markovic *et al.*, 2007). La complejidad del proceso de angiogénesis y el hecho de que los melanomas malignos produzcan una gran variedad de factores proangiogénicos (Streit and Detmar, 2003) justificarían los resultados obtenidos con las estrategias antiangiogénicas iniciales, y ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias antiangiogénicas más eficaces. La combinación de drogas antiangiogénicas y quimioterapéuticos convencionales sí reporta un pequeño aumento en la supervivencia de los pacientes con melanoma avanzado (González-Cao *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2009; Varker *et al.*, 2007).

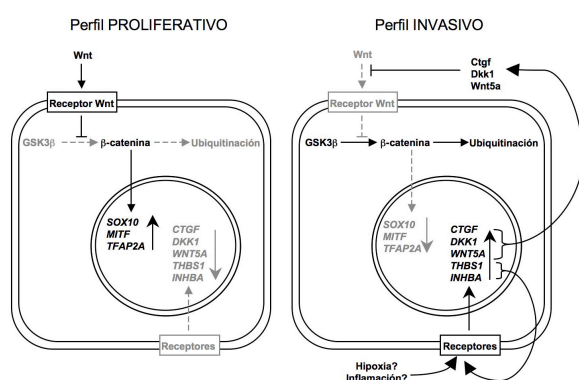
## 2.4. Clasificación molecular de los melanomas y nuevos modelos de progresión

La clasificación de melanomas malignos basándose en sus características histopatológicas es uno de los métodos más generalizados para el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad. Uno de los criterios más empleados es su clasificación en función del grosor, siendo las lesiones de mayor grosor las más invasivas y con peor pronóstico (Fecher *et al.*, 2007). Sin embargo, frecuentemente se encuentran melanomas con un grosor muy pequeño que metastatizan rápidamente, mientras que un porcentaje significativo de lesiones de grosor elevado no cursan con enfermedad metastásica (Lomuto *et al.*, 2004; Slingluff *et al.*, 1988). La naturaleza heterogénea del melanoma y la dificultad para clasificarlo han suscitado numerosos estudios de análisis del perfil de expresión génica global que pretenden realizar una clasificación molecular de los melanomas (Fecher *et al.*, 2007; Hoek, 2007).

El estudio publicado por Bittner y colaboradores fue uno de los primeros trabajos en los que, mediante *microarrays* de cDNA, se subclasificó un conjunto de líneas celulares y biopsias de melanoma humano en grupos que diferían en el grado de agresividad y potencial metastásico (Bittner *et al.*, 2000). Posteriores estudios (Haqq *et al.*, 2005; Hoek, 2007; Pavey *et al.*, 2004) han confirmado la gran heterogeneidad del melanoma y la importancia que tiene el microentorno tumoral en la determinación de los programas de expresión génica de las células de melanoma y en la progresión a metástasis. En este sentido, los trabajos publicados por M. Hendrix y colaboradores han puesto de manifiesto la enorme plasticidad del melanoma y su capacidad para ser reprogramado dependiendo del microentorno en que resida (Hendrix *et al.*, 2003; Postovit *et al.*, 2006). Las células de melanoma muy agresivas presentan un fenotipo transdiferenciado caracterizado por la expresión aberrante de genes normalmente restringidos a otros linajes celulares, y por la pérdida de genes específicos del linaje melanocítico, como *TYR* y *MLANA* (Hendrix *et al.*, 2003). Además, las células de melanoma muy agresivas pueden adquirir un fenotipo “vascular”, mediante la expresión de genes característicos de células endoteliales, y formar así estructuras y redes tubulares que mimetizan los microvasos sanguíneos. Esta capacidad es conocida como *vasculogenic mimicry*, y es un ejemplo de la plasticidad de las células de melanoma (Seftor *et al.* 2002). Estas estructuras se pueden poner de manifiesto en modelos experimentales de melanoma y recapitulan las observadas en biopsias de pacientes con melanomas muy agresivos. La presencia de canales de células de melanoma en biopsias correlaciona con mal pronóstico (Folberg *et al.*, 2000; Hendrix *et al.*, 2003; Maniotis *et al.*, 1999).

La capacidad de reprogramación del melanoma y la importancia del microentorno se ponen de manifiesto cuando se utilizan modelos que recrean microambientes específicos, y sobre los que se evalúa la posibilidad de modificar el fenotipo de las células de melanoma. En un estudio reciente del grupo de M. Hendrix se utiliza un modelo embrionario de pollo y se transplantan células de melanoma muy agresivas en la zona de la cresta neural. Este microambiente embrionario es capaz de revertir parcialmente el fenotipo agresivo de las células de melanoma, que acaban comportándose como células de la cresta neural, y expresando antígenos propios de éstas (Hendrix *et al.*, 2007). De igual manera, la

exposición de células de melanoma agresivas a matrices extracelulares de colágeno preconditionadas por células madre embrionarias *in vitro* consigue igualmente una reprogramación de las células de melanoma hacia un fenotipo menos agresivo (Hendrix *et al.*, 2007; Postovit *et al.*, 2006). En cambio, la exposición de las células de melanoma agresivas a una matriz preconditionada por melanocitos primarios no tiene efecto sobre las células de melanoma, mientras que sí ocurre a la inversa, donde los melanocitos primarios adquieren un fenotipo más invasivo tras crecer sobre una matriz preconditionada por células de melanoma muy agresivas (Seftor *et al.*, 2005). Estos cambios son reversibles, puesto que las células eventualmente recuperan su fenotipo normal tras ser retiradas de la matriz preconditionada (Hendrix *et al.*, 2007).

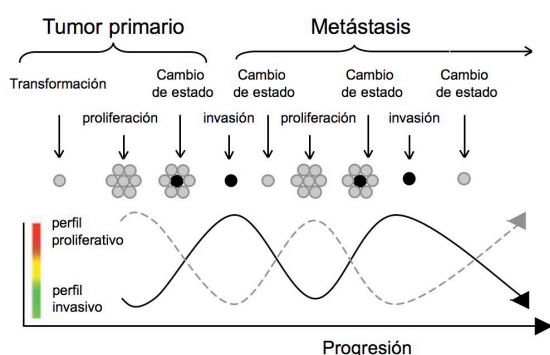


**Figura 7. Clasificación molecular del melanoma: perfiles de expresión génica proliferativo e invasivo del potencial metastásico en melanoma.** En las células de perfil proliferativo (izquierda), la señalización por factores Wnt promueve la translocación de la β-catenina al núcleo, donde participa en la regulación de *MITF* y otros genes que promueven la proliferación celular. En las células de perfil invasivo (derecha), la modificación del microentorno por hipoxia, inflamación o por TGFβ inhibe la señalización de la vía Wnt, conduciendo a la β-catenina a degradación por ubiquitinación y promoviendo la expresión de factores que inducen un fenotipo más invasivo. (Adaptado de (Hoek *et al.*, 2006)).

En los últimos años los grupos de K. Hoek (Hoek *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2006) y C. Goding (Carreira *et al.*, 2006) han propuesto un nuevo modelo de progresión del melanoma que intenta explicar la heterogeneidad de este cáncer e integrar la enorme plasticidad y capacidad de reprogramación que muestran las células de melanoma. Mediante la combinación de un análisis global de la expresión génica en series grandes de líneas celulares de melanoma (Hoek *et al.*, 2006) y análisis funcionales utilizando diversos modelos experimentales (Carreira *et al.*, 2006; Hoek *et al.*, 2006), se identificaron firmas de expresión molecular que diferencian a las líneas celulares de melanoma en dos grupos principales: un cohorte con una alta capacidad proliferativa y bajo potencial invasivo (perfil proliferativo); y otro cohorte poco proliferativo, pero altamente invasivo (perfil invasivo) (Figura 7). En las células de perfil proliferativo, la vía Wnt/β-catenina se encuentra activada y promueve la expresión de *MITF* y otros genes diana. En cambio, las células de perfil invasivo presentan niveles muy bajos o indetectables de *MITF*, debido a la inhibición de la vía Wnt/β-catenina promovida por modificaciones del microentorno (hipoxia, inflamación) y por el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ). En consecuencia, las células de perfil invasivo expresan genes asociados con la modificación del microentorno tumoral (factor de crecimiento de tejido conectivo (*CTGF*) o *WNT5A*, entre otros).

Este modelo, denominado *phenotype switching* (Figura 8), considera que la metástasis requiere la alternancia de dos estados fenotípicos (proliferativo e invasivo) determinados por programas de expresión génica bien diferenciados (perfil proliferativo y perfil invasivo). La expresión de estos

programas en las células de melanoma es excluyente y, por ello, el proceso de metástasis requiere necesariamente que la célula cambie de un programa a otro en función de la etapa del proceso metastásico en la que se encuentre (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2008). De esta forma, la progresión de la enfermedad no acontecería por la intensificación gradual de ambos programas (como establece el modelo de la evolución clonal (Miller and Mihm, 2006)), sino por el cambio alternante entre uno y otro, dirigido en gran medida por la señales que le llegan a las células de melanoma del microentorno donde residen (Carreira *et al.*, 2006; Hoek, 2009; Hoek *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2006). En un tumor primario inicialmente predominarían células malignas de perfil/fenotipo proliferativo. La reprogramación de algunas células en el tumor al perfil/fenotipo invasivo permitiría la invasión local, su posterior diseminación y la colonización de un órgano distante. Una vez allí, de nuevo se requeriría una reprogramación al perfil/fenotipo proliferativo para poder desarrollar un foco tumoral secundario. Las reprogramaciones inherentes a la progresión del melanoma en este modelo explicarían la heterogeneidad encontrada tanto en las lesiones primarias como en las metástasis de melanoma.



**Figura 8. Modelo del *phenotype switching*.** La lesión primaria del melanoma está formada por células de perfil proliferativo. A continuación, una señal desconocida procedente de una alteración de las condiciones del microentorno (p.ej. hipoxia, inflamación o TGF $\beta$ ) produce un cambio que da lugar a células de perfil invasivo, que escapan de la lesión primaria y, tras colonizar un sitio distal apropiado, vuelven a su estado proliferativo y forman una nueva metástasis, repitiéndose el ciclo de nuevo. Cada cambio en el fenotipo, o cambio de estado, se ve acompañado de un cambio en el grupo de genes expresados del perfil proliferativo al invasivo, y viceversa (Adaptado de (Hoek *et al.*, 2008)).

Por último, recientemente han aparecido múltiples evidencias que sugieren que el mantenimiento y la progresión tumoral podría llevarse a cabo por subgrupos minoritarios y especializados de células “iniciadoras tumorales”, dentro de la hipótesis de las *cancer stem cells* (Schatten and Frank, 2008; Smalley and Herlyn, 2009; Visvader and Lindeman, 2008). Varios estudios en melanoma han mostrado subpoblaciones celulares con capacidad para iniciar tumores, que presumiblemente estarían dirigiendo el crecimiento del tumor y, al mismo tiempo, dando lugar al resto de células “no iniciadoras” y más diferenciadas de la lesión (Fang *et al.*, 2005; Quintana *et al.*, 2008; Schatten *et al.*, 2008). Asimismo, este modelo podría explicar la recurrente evasión de la terapia de esta enfermedad, dado que al tener estas células una tasa proliferativa baja, no estarían siendo afectadas por las terapias anticancerígenas convencionales (Smalley and Herlyn, 2009).



## **OBJETIVOS**



PEDF es un potente inhibidor endógeno de la angiogénesis y, adicionalmente, es capaz de modular diversos aspectos funcionales de las células tumorales que son relevantes para su progresión maligna. Este factor multifuncional se expresa de forma endógena en diversos tipos celulares y su expresión se regula negativamente durante la malignización de varios tipos de cáncer. Resultados previos del laboratorio pusieron de manifiesto los potentes efectos antimetastásicos en melanoma de estrategias basadas en la transducción de melanomas con retrovirus que permiten la sobreexpresión de PEDF. Utilizando una combinación de abordajes *in vitro* e *in vivo* se determinó que el mecanismo de acción antimetastásica de PEDF está basado en su dualidad como factor inhibidor de la angiogénesis y como factor antitumoral directo, capaz de inhibir la migración, invasión y supervivencia de las células de melanoma. Al inicio del presente trabajo de Tesis Doctoral no se había abordado el estudio de la expresión de PEDF en los melanocitos cutáneos, ni la posible correlación entre la pérdida de expresión de este factor y la progresión maligna del melanoma humano.

Considerando estos antecedentes, nos propusimos profundizar en la posible contribución de la pérdida de expresión de PEDF a la progresión maligna del melanoma, en sus implicaciones funcionales en la biología del melanoma y en el mecanismo de acción antitumoral directo de PEDF en este tipo de cáncer.

Los objetivos concretos que se han abordado en esta Tesis Doctoral son:

1. Analizar la posible correlación entre la expresión de PEDF y la progresión maligna y agresividad del melanoma humano.
2. Evaluar las implicaciones funcionales de PEDF en la biología del melanoma y, en particular, en el proceso de metástasis del melanoma.
3. Determinar las implicaciones funcionales de PEDF en la biología de los melanocitos.
4. Profundizar en el mecanismo de acción antitumoral directo de PEDF en el melanoma.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cultivo celular

En la Tabla 1 se detallan las líneas celulares utilizadas, su origen, procedencia y el medio de cultivo en el que se crecieron; en todos los casos se mantuvieron a 37° C en atmósfera húmeda al 5% CO<sub>2</sub>.

**Tabla 1. Líneas celulares empleadas** (todas de origen humano salvo que se especifique otro origen).

Línea celular	Origen (Referencia)	Procedencia	Medio de cultivo
SBcl2	Melanoma cutáneo RGP (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM35	Melanoma cutáneo RGP (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM3248	Melanoma cutáneo VGP (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM278	Melanoma cutáneo VGP (Satyamoorthy <i>et al.</i> , 1997)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
WM164	Metástasis de melanoma cutáneo en nódulo linfático (Herlyn <i>et al.</i> , 1990)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
1205Lu	Metástasis experimental de melanoma cutáneo en ratón (Juhász <i>et al.</i> , 1993)	Dr. M. Herlyn	W489 2% FBS*
BLM	Metástasis experimental de melanoma cutáneo en ratón (Van Muijen <i>et al.</i> , 1991)	Dr. Van Muijen	DMEM 10% FBS**
A375	Metástasis de melanoma cutáneo en nódulo linfático (Giard <i>et al.</i> , 1973)	Dr. F. Vidal-Vanaclocha	DMEM 10% FBS**
C81-61	Metástasis de melanoma cutáneo en pared abdominal (Seftor <i>et al.</i> , 2005)	Dra. M. Hendrix	RPMI 10% FBS + 1x MITO***
C8161	Metástasis de melanoma cutáneo en pared abdominal (Seftor <i>et al.</i> , 2005)	Dra. M. Hendrix	RPMI 10% FBS****
M010817	Metástasis de melanoma cutáneo (Hoek <i>et al.</i> , 2006)	Dr. K. Hoek	RPMI 10% FBS****
HEK-293T	Células del epitelio de riñón embrionario immortalizadas con el antígeno T-largo del virus SV40 (DuBridge <i>et al.</i> , 1987)	Dr. A. Bernad	DMEM 10% FBS**
NIH-3T3	Fibroblastos embrionarios murinos immortalizados (Jainchill <i>et al.</i> , 1969)	Dr. I. Palmero	DMEM 10% FBS**
Y79	Retinoblastoma (Reid <i>et al.</i> , 1974)	Dra. N. Bouck	RPMI 20% FBS <sup>#</sup>
HepG2	Hepatocarcinoma (Aden <i>et al.</i> , 1979)	Dr. L. del Peso	DMEM 10% FBS **

\* Mezcla 4:1 de medio MCDB 153 y L-15 suplementada con 2% suero fetal bovino (FBS) (Gibco), 5 µg/ml insulina (Sigma), 1,68 mM CaCl<sub>2</sub> (Merck), 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ml estreptomicina (Gibco), 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

\*\* Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 2 mM glutamina (Gibco), 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ml estreptomicina (Gibco), 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

\*\*\* Medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*) (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 1x MITO *Serum Extender* (BD Biosciences), 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ml estreptomicina (Gibco), 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

\*\*\*\* Medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ml estreptomicina (Gibco), 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

<sup>#</sup> Medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 20% FBS, 2 mM glutamina, 50 U/ml penicilina (Gibco), 50 µg/ml estreptomicina (Gibco), 2,5 µg/ml fungizona (Sigma).

Además, se utilizaron cultivos primarios humanos de melanocitos, células endoteliales microvasculares (HMVEC) y fibroblastos establecidos en el laboratorio a partir de piel según se describe en los apartados 1.1-1.3.

Por último, en algunos experimentos se utilizaron cultivos primarios establecidos en otros laboratorios: queratinocitos primarios (cedidos por la Dra. del Río) y hepatocitos primarios (cedidos por la Dra. A.M. Valverde).

### **1.1. Establecimiento de cultivos primarios de melanocitos**

Se obtuvieron cultivos primarios de melanocitos mediante el siguiente procedimiento [modificado de (García-López *et al.*, 2005)] en condiciones de esterilidad:

- Se utilizaron muestras de piel procedentes de operaciones de fimosis de niños entre 3-14 años realizadas en el Hospital Niño Jesús de Madrid. Las muestras son anónimas y se procesaron independientemente.

- Se lavó cada piel con PBS y antibióticos, y se cortó en trozos pequeños en una placa de cultivo.

- Se añadieron 10 ml de 5 mg/ml dispasa II (Roche) y se incubó durante la noche a 4° C.

- Utilizando dos pinzas curvas se separó mecánicamente la epidermis de la dermis, descartándose ésta última.

- Se añadieron 2 ml de 0,05% Tripsina/0,53 mM EDTA (Gibco) y se incubó durante 20 min a 37° C en agitación.

- Se disgregó con una pipeta y se pasó a través de un filtro de 70 µm (*strainer*, BD) junto con 15 ml de medio con suero.

- Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado y se sembraron las células en medio 254 (M254) suplementado con *Human Melanocyte Growth Supplement* (HMGS, Cascade Biologics). Estas condiciones de cultivo son óptimas para el crecimiento de melanocitos y desfavorables para los queratinocitos. Adicionalmente, mediante tripsinización selectiva se pudieron eliminar los queratinocitos que persistieron ocasionalmente en algunos cultivos, ya que los melanocitos son las primeras células que se levantan de la placa, quedando los queratinocitos adheridos a la misma.

### **1.2. Establecimiento de cultivos primarios de células endoteliales microvasculares (HMVEC)**

Los cultivos primarios de HMVEC fueron establecidos según el siguiente protocolo [modificado de (Davison *et al.*, 1980)] en condiciones de esterilidad:



- Se utilizaron muestras de piel procedentes de operaciones de fimosis de niños entre 3-14 años realizadas en el Hospital Niño Jesús de Madrid. Las muestras son anónimas y se procesaron en grupos de 3 a 4 donantes, ya que el procedimiento de aislamiento de células endoteliales es mucho menos eficiente que el de los melanocitos, al requerir un paso de purificación mediante anticuerpos específicos.

- Se lavó cada grupo de pieles con PBS y antibióticos, se cortó en trozos pequeños que se reunieron en un solo tubo.

- Se incubó con 2 ml de 5 mg/ml colagenasa P (Roche) durante 30 min a 37° C en agitación.

- Se pasó por un filtro de 70 µm (*strainer*) junto con 15 ml de medio con 10% FBS, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio MCDB131 (Sigma) suplementado con 10% FBS, 10 ng/ml factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Preprotech), 16,32 µg/ml extracto de pituitaria bovina (Invitrogen) y 1µg/ml hidrocortisona (Sigma). Las células se sembraron en placas cubiertas con 0,5% gelatina (Difco) en PBS, y al día siguiente las placas se lavaron exhaustivamente con PBS para eliminar las células no adheridas.

- Posteriormente las células endoteliales se purificaron según se describe a continuación:

· incubación con un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína de membrana CD31 (marcador específico de células endoteliales) durante 30 min a 4° C. Se utilizó una dilución 1:3 en PBS del sobrenadante TP1/15, cedido por el Dr. Sánchez-Madrid (Díaz-González *et al.*, 1995).

· tras dos lavados con PBS, se incubó con anticuerpos específicos contra IgG de ratón unidos a bolas magnéticas (Dyna Beads, Dynal) durante 20 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron 1:100 en PBS con 5% FBS.

· se lavó dos veces con PBS, se tripsinizaron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS.

· separación magnética de los complejos anti-CD31-célula endotelial: las células se pusieron en un *ependorf* colocado en un imán (Dynal), y tras 2 minutos se descartó el sobrenadante (células no endoteliales no unidas a CD31). El precipitado unido a la pared en contacto con el imán (células endoteliales con el complejo anticuerpo anti-CD31-anti-IgG unido a las bolas magnéticas) se resuspendió en 1 ml de PBS, y se volvió a colocar en el imán, repitiéndose este proceso de lavado tres veces. Finalmente, se resuspendieron las células endoteliales en el medio de cultivo anteriormente descrito y se sembraron en placas cubiertas con 0,5% gelatina.

### 1.3. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos

Los cultivos primarios de fibroblastos se establecieron siguiendo el protocolo descrito para los cultivos de HMVEC. En la etapa de la purificación de HMVEC, los fibroblastos quedan en los

sobrenadantes de la purificación (células no unidas a bolas magnéticas), que se guardaron y tras su centrifugación se sembraron en placas con DMEM 10% FBS.

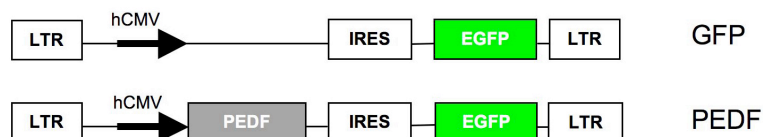
Se realizó una caracterización morfológica y mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos de los cultivos primarios de melanocitos (MITF) y de células endoteliales (CD31). En cuanto a los cultivos primarios de fibroblastos, se confirmó bajo observación al microscopio de contraste de fases que mostraban la típica morfología fusiforme, así como el citoplasma con proyecciones largas y finas, y mediante inmunofluorescencia se comprobó que no expresaban CD31. En el caso de los melanocitos primarios, se analizó adicionalmente mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de dos genes específicos de melanocitos como *MITF* (Levy *et al.*, 2006) y *MLANA* (Coulie *et al.*, 1994).

## 2. Plásmidos utilizados

Se emplearon vectores de expresión plasmídicos y lentivirales y construcciones de promotores fusionadas a luciferasa.

- pCEP4-PEDF: vector de expresión de PEDF humano controlado bajo el promotor del citomegalovirus (CMV), cedido por la Dra. N. Bouck.

- prrl.CMV.PEDF.IRES.EGFP.wpre.SIN: el vector de expresión lentiviral bicistrónico de PEDF se construyó clonando el cDNA del *PEDF* humano (amplificado por PCR a partir del vector de expresión pCEP4-PEDF) en el vector lentiviral de tercera generación prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN (cedido por el Dr. A. Bernad) (Figura 9). Brevemente, se amplificó por PCR el cDNA de *PEDF* y se insertaron los sitios XbaI y XbaI+EcoRV en los extremos 5' y 3', respectivamente, utilizando los cebadores 5'-CTAGTCTAGAGGCCCCAGGATGCAGGCCCTG-3' y 5'-GGCCTCTAGATATCTTAGGGGCCC CTGGGGTCCAG-3'. A continuación este fragmento se clonó en un vector de clonaje TA (Invitrogen), se digirió con EcoRV y XbaI, y finalmente se clonó en el vector prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN digerido con XbaI y BamHI. Como control se utilizó el vector vacío prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN. De aquí en adelante, las células transducidas con lentivirus en los que se ha empaquetado el vector de sobreexpresión de PEDF prrl.CMV.PEDF.IRES.EGFP.wpre.SIN se identifican como (lenti)-PEDF, y las células transducidas con lentivirus en los que se ha empaquetado el vector control prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN como (lenti)-GFP.

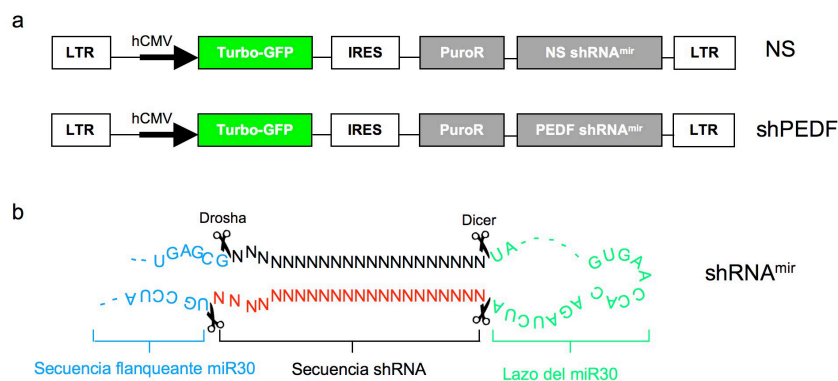


**Figura 9. Vector lentiviral de sobreexpresión de PEDF.** Esquemas del vector control (GFP, arriba) y de sobreexpresión de PEDF (PEDF, abajo). LTR, repeticiones terminales largas. hCMV, promotor del citomegalovirus humano. IRES, sitio interno de entrada de ribosomas. EGFP, proteína fluorescente verde mejorada.

- pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-PEDF: vector lentiviral de segunda generación (pGIPz) que expresa la secuencia de interferencia shRNA<sup>mir</sup> VL2HS\_221662 (Open Biosystems) dirigida contra el RNA mensajero (mRNA) de *PEDF* humano. Bajo el control del promotor CMV se transcribe un mRNA bicistrónico que da lugar a la Turbo-GFP, la resistencia a puromicina y a la secuencia shRNA<sup>mir</sup> VL2HS\_221662, que es una secuencia híbrida en la que se incorporan secuencias del microRNA-30 humano (miR30) y la secuencia shRNA (*short hairpin* RNA) para interferir específicamente la expresión de PEDF (shPEDF) (Figura 10) (Chang *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2005). El transcrito primario shRNA<sup>mir</sup> VL2HS\_221662 generado a partir del vector pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-PEDF es procesado posteriormente por la maquinaria celular de RNA de interferencia (RNAi) para dar lugar a la secuencia shRNA PEDF (He and Hannon, 2004). Este transcrito primario presenta una horquilla con un “tallo” de 22 nucleótidos (nt) de RNA de doble cadena (dsRNA), que contiene la secuencia del shRNA correspondiente; y un “lazo” de 19 nt del miR30 humano, así como 125 nt de la secuencia flanqueante del miR30 a ambos lados de la horquilla, que aumenta considerablemente la eficiencia de procesamiento por las enzimas Droscha y Dicer (Figura 10b) (Silva *et al.*, 2005).

Como control se utilizó una secuencia shRNA<sup>mir</sup> NS (*Non-silencing*) que no presenta homología con ningún gen conocido de mamíferos, generada mediante el vector pGIPz-shRNA<sup>mir</sup> NS (Open Biosystems). De aquí en adelante, se denomina -shPEDF a las células transducidas con lentivirus en los que se ha empaquetado el vector pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-PEDF, y -NS a las células transducidas con lentivirus en los que se ha empaquetado el vector pGIPz-shRNA<sup>mir</sup> NS.

- pGL-2000-IL8-Luc: plásmido cedido por el Dr. J. Raingeaud (Raingeaud and Pierre, 2005) y que contiene las 2000 pares de bases (pb) anteriores al inicio de transcripción del gen interleuquina 8 (*IL8*) delante del gen de la luciferasa (pGL3-basic, Promega).



**Figura 10. Vector lentiviral de interferencia de PEDF.** (a) Esquemas del vector control pGIPz-shRNA<sup>mir</sup> NS (arriba) e interferente para PEDF pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>-PEDF (shPEDF, abajo). LTR, repeticiones terminales largas. hCMV, promotor del citomegalovirus humano. IRES, sitio interno de entrada de ribosomas. PuroR, gen de resistencia a puromicina. shRNA<sup>mir</sup>, secuencia de interferencia. (b) Esquema de la secuencia de interferencia shRNA<sup>mir</sup>. El shRNA<sup>mir</sup> se expresa como un transcrito primario híbrido entre un shRNA y secuencias del miRNA-30 humano (miR30). Este transcrito primario presenta una horquilla con un “tallo” de 22 nucleótidos (nt) de RNA de doble cadena (dsRNA), con la secuencia del shRNA correspondiente; y un “lazo” de 19 nt del miR30 humano, así como 125 nt de la secuencia flanqueante del miR30 a ambos lados de la horquilla, que aumenta considerablemente la eficiencia de procesamiento por las enzimas Droscha y Dicer.

### 3. Generación de partículas lentivirales

Se produjeron partículas lentivirales anfotrópicas no replicativas para la sobreexpresión de PEDF (utilizando vectores lentivirales de tercera generación) o para la interferencia de PEDF (empleando vectores lentivirales de segunda generación) según se ha descrito previamente (Punzón *et al.*, 2004).

Brevemente, se sembraron  $6 \times 10^6$  células HEK-293T en placas de 10 cm<sup>2</sup> y al día siguiente fueron co-transfectadas usando fosfato cálcico en presencia de 30  $\mu$ M cloroquina (Sigma) durante 8 h con los siguientes plásmidos:

- vector: 14,2  $\mu$ g
- plásmido(s) empaquetador(es): 12,45  $\mu$ g psPAX2 (para los vectores de segunda generación pGIPz-shRNA<sup>mir</sup>) o la mezcla 9  $\mu$ g RRE + 3,45  $\mu$ g REV (para los vectores de tercera generación prrl.CMV.EGFP.wpre.SIN y derivados)
- plásmido de la envuelta [envuelta glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular (VSVg)] pMD2.G: 4,7  $\mu$ g

Tras las 8 h, se retiró el medio y se añadió medio fresco. Al día siguiente, se volvió a renovar el medio, y 24 h más tarde se recogieron los sobrenadantes conteniendo partículas lentivirales, se centrifugaron a 1500 rpm para eliminar restos celulares, se filtraron (0,45  $\mu$ m) y se congelaron a -80° C.

De esta manera se produjeron sobrenadantes de lentivirus para sobreexpresar PEDF (PEDF y su control GFP) y lentivirus de interferencia de PEDF (shPEDF y su control no interferente NS).

La titulación de los sobrenadantes se realizó en células HEK-293T mediante la evaluación del porcentaje de células GFP positivas (GFP<sup>+</sup>) determinado por separación celular activada por fluorescencia (FACS) las 72 h de la infección, obteniéndose normalmente títulos de más de  $3 \times 10^6$  unidades de transducción/ml (TU/ml). Para el cálculo del título se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{TU/ml} = (\% \text{ GFP}^+ \times \text{n}^\circ \text{ células en el momento de la infección}) / \text{volumen virus (ml)}$$

#### 4. Transducción de células mediante infección lentiviral

Para sobreexpresar o interferir PEDF en melanocitos primarios y líneas celulares de melanoma, se añadieron los sobrenadantes lentivirales correspondientes al medio de cultivo a una multiplicidad de infección (MOI) de 10-60, dependiendo de la línea celular, en presencia de 8 µg/ml polibreno (Sigma) durante 8 h, dando lugar típicamente a más del 95% de células transducidas (GFP positivas). Tras 72 h, se evaluó el grado de sobreexpresión o interferencia. Con respecto a las líneas celulares de sobreexpresión de PEDF, éstas se enriquecieron para la expresión de GFP utilizando un citómetro de flujo con separador de células FACSVantage SE (Becton Dickinson), seleccionando el 20% de las células con mayor expresión de GFP. En el caso de las líneas celulares de interferencia de PEDF, éstas se seleccionaron con 0,25-1 µg/ml puomicina (Calbiochem -Novabiochem Corp.) durante 4 días.

#### 5. Transfección de células para la generación de líneas estables

La línea celular de melanoma A375 fue modificada para que produjera altos niveles de PEDF de forma estable mediante transfección de 10,8 µg de plásmido pCEP4-PEDF o p-CEP4 y 21,6 µl de jetPEI (Polyplus Transfection) en placas de 21 cm<sup>2</sup> durante 4 h. Posteriormente, se seleccionó el conjunto de células transfectadas o clones individuales con 300 µg/ml higromicina B (Sigma) durante 2 semanas. Los clones se aislaron mediante cilindros de clonaje. Finalmente, se caracterizó la expresión de PEDF en las líneas celulares mediante *Western blot* del medio condicionado y RT-PCR cuantitativa.

#### 6. Ensayo de transactivación de promotor

Para medir la actividad transcripcional de un promotor se utilizó un sistema reportero dual de luciferasa y renilla.

Se sembraron 50.000 células en pocillos de placas de 24 pocillos (cada condición por triplicado). Al día siguiente se transfectaron mediante lipofección con las siguientes cantidades por pocillo: 300 ng de plásmido pGL-2000-IL8-Luc y 20 ng de plásmido renilla pRL-SV40 (Promega) en 50 µl OptiMEM (Gibco); y 1 µl Lipofectamina-2000 (Invitrogen) en 50 µl OptiMEM. Se incubaron los complejos durante 4 h y se cambió el medio. Al día siguiente y tras tres lavados con PBS, se trataron las células con medio con 10% FBS o 10 ng/ml factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) (Preprotech) en medio basal, durante 24 h. A continuación se congelaron las placas a -80° C y posteriormente se lisaron y se midieron las actividades luciferasa y renilla con el *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) en un luminómetro Glomax 96-microplate Reader (Promega). La actividad luciferasa se

normalizó por la actividad renilla (luc/renilla) y se calcularon las medias y desviaciones estándar de los triplicados. Todos los experimentos se repitieron, al menos, tres veces.

## 7. Extracción de proteínas, preparación de medios condicionados y *Western blot*

### 7.1. Extracción de proteínas celulares totales

Se obtuvieron extractos de proteínas celulares totales homogeneizando las células con tampón RIPA [50 mM tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% azida sódica, 0,1% dodecil sulfato sódico (SDS), 1% NP-40, 1% deoxicolato sódico, inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )) e inhibidores de proteasas (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF))] sobre hielo durante 15 min. Se recogió el lisado, se sonizó durante 10 min y se centrifugó durante 10 min a 11000 rpm a 4° C para descartar los restos celulares. A continuación, se analizó la concentración de proteínas mediante el kit *BioRad DC protein assay* (compatible con detergentes y basado en el método de Lowry). Finalmente se añadió tampón *Laemmli* (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM ditioneitol (DTT), 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) a los extractos, se incubaron durante 5 min a 100° C y se almacenaron a -80° C.

### 7.2. Fraccionamiento subcelular

Para la obtención de fracciones de proteínas citoplásmicas o nucleares, se recogieron las células y se resuspendieron en tampón RSB (10 mM tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , e inhibidores de fosfatasa (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y proteasas (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina, 1 mM PMSF)) a una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^6$  células/ml. Se incubó sobre hielo durante 10 min y se añadió NP-40 a una concentración final del 1% durante otros 10 min más. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm a 4° C, quedando en el sobrenadante la fracción proteica citoplásmica. Se lavó el precipitado (núcleos) con 500  $\mu\text{l}$  de tampón 1% NP-40 en tampón RSB, y se centrifugó de nuevo durante 5 min a 2000 rpm a 4° C. Se lavó el precipitado otras dos veces con tampón RSB, y tras el segundo lavado se centrifugó durante 5 min a 11000 rpm a 4° C. Posteriormente se resuspendió el precipitado en tampón NB (10 mM tris-HCl pH 7,5, 0,4 M NaCl, 1mM EDTA e inhibidores de fosfatasa (1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y proteasas (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina, 1 mM PMSF)), se agitó en la noria durante 15 min a 4° C, y se centrifugó durante 5 min a 11000 rpm a 4° C, descartándose el precipitado, y congelando el sobrenadante con tampón *Laemmli* (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) a -80° C.

### 7.3. Preparación de medios condicionados de cultivos celulares

Se sembraron una o varias placas de 10  $\text{cm}^2$  de cada línea celular. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 10 ml de medio sin suero. 24 o 48 h más tarde se recogieron los medios condicionados (MC), se centrifugaron a 1500 rpm para eliminar los

restos celulares, se añadió 1 mM PMSF, y se concentraron por centrifugación a 4° C con centricones Amicon Ultra (Millipore), con un tamaño de exclusión de 10 kDa. Se lavó el concentrado tres veces con PBS y se concentró unas sesenta veces hasta un volumen aproximado de 150 µl. Posteriormente se midió la cantidad de proteína mediante el reactivo Bradford (Bio-Rad), y se alicuoteó y almacenó a -80° C.

#### **7.4. Inmunodetección de proteínas mediante *Western Blot***

Las muestras de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS), en los que se cargaron entre 1-3 µg de MC o 15-30 µg de extracto proteico por cada carril. Posteriormente los geles se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Pall Corporation) mediante electrotransferencia líquida a 100 V a 4° C durante 2 h (tampón de transferencia: 39 mM glicina, 48 mM tris, 20% metanol). A continuación se incubaron en tampón de bloqueo (0,1% Tween-20, 5% leche desnatada en TBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en tampón de bloqueo (Tabla 2) durante la noche a 4° C. Tras tres lavados con tampón de lavado (0,1% Tween-20 en TBS) se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en tampón de bloqueo (Tabla 3) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo tres veces con tampón de lavado y mediante una reacción de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham) se detectaron las bandas por autorradiografía (Konica).

Las imágenes se adquirieron con un escáner Epson Perfection 1250 y se cuantificaron con el programa ImageJ (*National Institutes of Health* (NIH), USA).

#### **7.5. ELISA**

La detección de las proteínas PEDF e IL8 secretadas por las células correspondientes al MC se realizó utilizando los kits *ELISAquant PEDF Sandwich ELISA Antigen Detection Kit* (Bioproducts MD) y *Human CXCL8/IL8 Quantikine ELISA Kit* (R&D), respectivamente, según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron MC de 24 h o 48 h sin concentrar, y en los que se conocía el número de células en el momento de la recogida del MC.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados para *Western blot* (WB), inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHC).**

Antígeno	Especie	Proveedor	Dilución	
			WB	IF / IHC
PEDF humano	Ratón	Chemicon	1:1200	
PEDF humano	Conejo	Bioproducts	1:1500	1:3000
E-cadherina humana	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:1000	1:100
N-cadherina humana	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:500	
$\beta$ -tubulina humana	Ratón	Sigma	1:40000	
$\beta$ -actina humana	Cabra	Santa Cruz	1:1000	
GFP <i>Aequorea victoria</i>	Conejo	Abcam		1:400
MITF humano	Ratón	Neomarkers Labvision, clone C5	1:500	1:250
$\beta$ -catenina humana	Ratón	BD Transduction Laboratories	1:20000	1:200
Lámina B humana	Cabra	Santa Cruz	1:1000	1:200

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa para WB.**

Anticuerpo	Especie	Proveedor	Dilución
IgG de ratón	Cabra	Promega	1:10000
IgG de conejo	Cabra	MP Biomedicals	1:10000
IgG de cabra	Burro	Santa Cruz	1:4000

## 8. Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los tejidos se procesaron para su análisis posterior fijándolos en formalina y embebiéndolos en parafina.

### 8.1. Inmunohistoquímica en biopsias de melanoma

Se utilizaron secciones de 5  $\mu$ m de biopsias de melanoma parafinadas. Se desparafinaron incubándolas a 65° C durante 30 min y tres lavados posteriores en xileno durante 3 min. A continuación, se rehidrataron mediante tres lavados de 3 min en etanol 100%, un lavado de 3 min en etanol 95%, un lavado de 3 min en etanol 80% y finalmente en agua destilada durante 5 min. Después se incubó en 10 mM tampón citrato (pH 6) durante 10 min en un autoclave para el desenmascaramiento antigénico. Para la detección de los antígenos correspondientes se utilizó el kit *EnVision+ Alkaline Phosphatase System* (Dako) en un equipo de tinción automatizado (Ventana Medical Systems) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Este kit de tinción se basa en la detección del anticuerpo primario (ver Tabla 2 para las diluciones usadas) utilizando un anticuerpo secundario conjugado a la fosfatasa alcalina y usando *Fast Red* como sustrato de la enzima. Las secciones se tiñeron con una disolución de hematoxilina durante 3 min, se lavaron tres veces con agua, y se montaron en el medio de montaje acuoso Faramount (Dako).



### 8.2. Inmunofluorescencia en secciones de tumores en ratón

La desparafinización y rehidratación de las secciones de 5  $\mu\text{m}$  de tumores parafinados se llevó a cabo según se ha descrito en el apartado anterior. A continuación se incubó en tampón citrato durante 20 min en un autoclave para el desenmascaramiento antigénico. Las secciones se bloquearon en 10% suero de cabra en PBS durante 1 h, y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) diluidos en 2% suero de cabra en PBS durante la noche a 4° C. Tras cinco lavados con PBS, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos (Tabla 4) diluidos en 2% suero de cabra durante 40 min a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se tiñeron con 1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) para la detección de los núcleos, se lavaron tres veces, y se montaron en Permount (Fisher).

### 8.3. Inmunofluorescencia en cultivos celulares

Se sembraron las células sobre cubreobjetos de cristal de 10 mm de diámetro en placas multipocillo de 2  $\text{cm}^2$ . Se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron en 4% paraformaldehído en PBS durante 15 min. Se lavó con PBS y se bloqueó el paraformaldehído libre con glicina 0,1 M en PBS durante 15 min. Tras 3 lavados más con PBS se permeabilizó la membrana celular con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 15 min en agitación suave. Se lavó de nuevo con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos incubando con tampón de bloqueo (3% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS) durante 1 h en agitación suave. Posteriormente se incubó durante la noche a 4° C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo (ver Tabla 2 para las diluciones usadas). A continuación se lavó tres veces con PBS y se incubaron las células durante 45 min en oscuridad con el anticuerpo secundario marcado fluorescentemente diluido en tampón de bloqueo (Tabla 4). Después se lavó tres veces con PBS y se incubó con 1  $\mu\text{g/ml}$  DAPI en PBS durante 5 min en oscuridad para teñir los núcleos celulares. Se lavó de nuevo con PBS y se montaron las preparaciones sobre un portaobjetos en medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Molecular Probes) para conservar la fluorescencia.

El análisis de las imágenes se realizó con un microscopio confocal espectral TCS SP5 DMI6000, usando láseres de Argón (488 nm), HeNe (543 nm, 633 nm) y diodo violeta (405 nm). Las imágenes fueron obtenidas con el *software* de confocal LAS AF (Leica). Cada canal fue grabado independientemente y se generaron y superpusieron las imágenes de pseudocolor.

**Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos para inmunofluorescencia.**

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo conjugado	Proveedor	Dilución
IgG de conejo	Burro	Cy-3	Jackson Immunoresearch	1:200
IgG de ratón	Cabra	Alexa 546	Molecular Probes	1:500
IgG de cabra	Burro	Alexa 647	Molecular Probes	1:500

## 9. Extracción de RNA total

La extracción del RNA total de células en cultivo se realizó con el reactivo TRI-REAGENT (Molecular Research Centre) o mediante purificación por columnas utilizando el kit *RNeasy Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA extraído se determinó espectrofotométricamente en un *NanoDrop Spectrophotometer ND-100* (NanoDrop Biotechnologies) y, además, se analizó electroforéticamente en geles al 1% de agarosa teñidos con *SYBERSafe DNA Gel Stain* (Invitrogen).

## 10. RT-PCR cuantitativa

Los niveles celulares de mRNA fueron determinados mediante RT-PCR cuantitativa. Los ensayos se realizaron en el Servicio de Secuenciación del IIBM y en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid.

Se utilizaron sondas *TaqMan* (Applied Biosystems) para detectar los niveles de mRNA de *18S rRNA* (Hs99999901\_s1), *GAPDH* (Hs99999905\_m1), *IL8* (Hs00174103), *MLANA* (Hs00194133\_m1), *MITF* (Hs00165156\_m1) y *PEDF* (Hs00171467\_m1).

Se emplearon sondas UPL (*Universal Probe Library*, Roche) y cebadores específicos (Tabla 5) para detectar los niveles de mRNA de *COL4A2*, *FGF13*, *FN1*, *GAPDH*, *IGFBP3*, *IL8*, *JAG1*, *LGALS3*, *MLPH*, *RAB27A* y *TGFA*.

La detección de los niveles de mRNA de *E-cadherina* y *18S rRNA* se llevó a cabo utilizando cebadores específicos (Tabla 5) descritos previamente (Palmer *et al.*, 2004).

Para la síntesis de cDNA, se retrotranscribieron 250 ng de RNA con el *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems). A continuación se diluyó el cDNA cinco veces a una concentración final de 2,5 ng/μl. La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador *ABI Prism 7900 HT* (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 μl. Para las reacciones con sondas *TaqMan*, se añadieron 2 μl producto cDNA, 0,5 μl sonda *TaqMan 20x*, 5 μl *Master Mix 2x* (Applied Biosystems) y 2,5 μl agua destilada. Para reacciones con sondas UPL, en lugar de la sonda *TaqMan* se añadió la sonda UPL a una concentración final de 100 nM y cada cebador a una concentración final de 250 nM. En las reacciones para detectar los genes *E-cadherina* y *18S rRNA* se utilizó el *LightCycler-FastStart PLUS DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y anillamiento y extensión a 60°C durante 1 min. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Los datos fueron analizados con el programa *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) por el método de la cuantificación relativa por comparación de  $C_T$  (*threshold cycle*, umbral de detección establecido). En este método se calcula la media entre los triplicados, y los niveles de expresión del gen de interés se normalizan por la media de los triplicados del gen constitutivo utilizado (*GAPDH* o *18S rRNA*) en la misma muestra. A continuación, la cantidad de mRNA del gen de interés de una muestra

determinada (m) se expresa en relación a los niveles de dicho mRNA en una muestra calibradora (c). Así, la cantidad relativa de un gen de interés en una muestra m es igual a  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , donde  $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_m - (\Delta C_T)_c$ , siendo  $\Delta C_T = C_T$  gen interés  $- C_T$  gen constitutivo.

**Tabla 5. Sondas y secuencias de los cebadores utilizados para la detección de los genes correspondientes por RT-PCR cuantitativa.**

Gen	Sonda UPL	Cebador directo 5'-3'	Cebador reverso 5'-3'
<i>COL4A2</i>	#81	gggatatttggcctgaaagg	caggaagagcagcagaacct
<i>FGF13</i>	#56	ccattgatggcaccaaagat	ccacagggatgaggttaaca
<i>FN1</i>	#15	cttgggtcagcacacaacttc	cctcctcgagtctgaaccaa
<i>GAPDH</i>	#60	agccacatcgctcagacac	gcccaatacgaccaaattcc
<i>IGFBP3</i>	#4	agaagggtatttataagaaaaagcagt	cttatccacacaccagcagaag
<i>IL8</i>	#72	agacagcagagcacacaagc	cacagtggatggttccttc
<i>JAG1</i>	#42	gaatggcaacaaaacttgc	agccttgctcggaatagc
<i>LGALS3</i>	#59	cttctggacagccaagtgc	aaaggcaggtataaggcaca
<i>MLPH</i>	#67	cacagttgtgcctcccttg	ggcctcctcctctacatcg
<i>RAB27A</i>	#51	aggccagagaatccacctg	cgctgtcgtaagctacgaa
<i>TGFA</i>	#63	tgctgccactcagaaacagt	atctgccacagtcacctg
<i>E-cadherina</i>	-	agaacgcattgccacataactc	cattctgatcggttaccgtgatc
<i>18S rRNA</i>	-	ccagtaagtgcgggtcataagc	cctcactaaaccatccaatcgg

## 11. Análisis de expresión génica mediante *microarrays* de oligonucleótidos de genoma humano completo

Los patrones de expresión génica globales de las líneas celulares A375-pCEP4 y A375-pCEP4-PEDF se analizaron mediante *microarrays* de oligonucleótidos de genoma completo. Se utilizó el *microarray GeneChip Human Genome-U133 plus 2.0* (Affymetrix), que contiene más de 54.000 grupos de sondas (*probe sets*) para analizar los niveles de expresión de más de 47.000 transcritos y variantes, incluyendo más de 14.500 genes humanos bien caracterizados. Los *microarrays* se hibridaron por duplicado utilizando RNAs de experimentos independientes. Las hibridaciones y el procesamiento inicial de los datos obtenidos se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica Funcional del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

En primer lugar se determinó la integridad del RNA purificado con un *Bioanalyzer 2100* (Agilent). Se sintetizó cRNA biotinilado a partir de 2 µg de RNA total utilizando el *3' Amplification One-cycle Target labeling kit* (Affymetrix) y a continuación se fragmentó a 95° C durante 35 min en fragmentos de 35-200 bases. A continuación se hibridaron 10 µg de cRNA biotinilado y fragmentado

sobre *microarrays* HG-UI33 plus 2.0 (Affymetrix) a 45° C durante 16 h en un horno de hibridación a 60 rpm. Después los *microarrays* se lavaron y tiñeron en una *Affymetrix Fluidics Station 450* siguiendo los protocolos estándar de Affymetrix, y se escanearon en un *Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix).

Para la obtención de los valores de expresión génica normalizados se utilizó el algoritmo GCRMA (Wu *et al.*, 2004), que es una modificación del algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*) (Irizarry *et al.*, 2003). Brevemente, GCRMA es un método para la normalización y sumarización de las medidas de los niveles de intensidad de las sondas (*probe sets*) del *microarray*. Los niveles de intensidad de las sondas del *probe set* se corrigen por la señal de fondo, teniendo en cuenta la secuencia de cada sonda; se normalizan, para posteriormente poder comparar y analizar varios *microarrays* a la vez; y finalmente se suman, dando lugar a una única medida de expresión por cada *probe set*.

Se seleccionaron aquellos genes cuya expresión aumentaba o disminuía dos o más veces en las células A375-pCEP4-PEDF con respecto a las células control A375-pCEP4 en las dos hibridaciones independientes realizadas. Se utilizó el programa informático *Multiexperimental Viewer* (Microarray Software Suite, <http://www.tm4.org>) para generar mapas (*heat maps*) con los perfiles de expresión de los genes regulados. Para la clasificación funcional de los genes regulados se utilizaron las anotaciones de *Gene Ontology* y la información disponible en la base de datos *Gene* del NCBI y en estudios publicados en PubMed.

## 12. Análisis de datos de estudios de *microarrays* de melanoma disponibles en bases de datos públicas.

Para analizar la expresión de PEDF en series grandes de líneas celulares de melanoma y melanocitos primarios se utilizaron los datos de expresión génica de estudios publicados con *microarrays* de DNA de genoma humano completo disponibles en bases de datos públicas como GEO (*Gene Expression Omnibus*) u otras. Todos los estudios empleaban los *microarrays* HG-UI33A o HG-UI33 Plus 2.0 (Affymetrix).

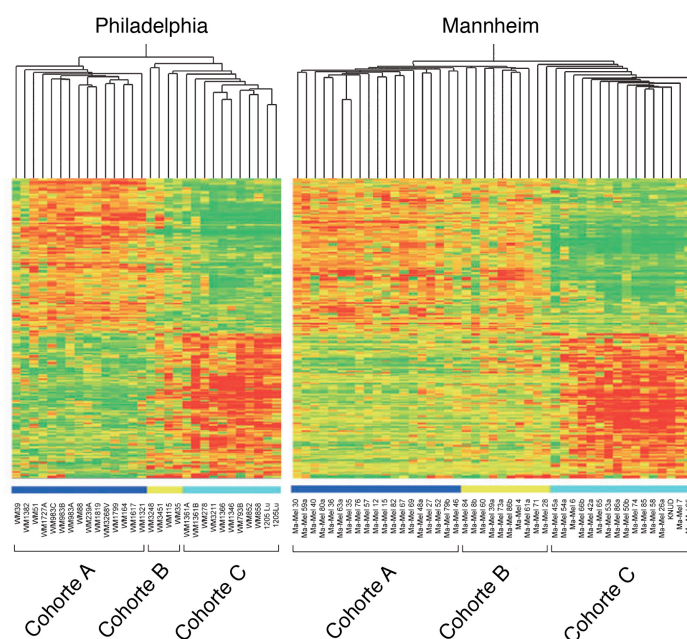
Para compilar los datos de 28 muestras de cultivos primarios de melanocitos se usaron 4 estudios: Hoek-2004 (número de acceso GEO GSE4570) (Hoek *et al.*, 2004); Hoek-2006 (GSE4840) (Hoek *et al.*, 2006); Ryu-2007 (extraído de *Public Library of Science* (<http://www.plosone.org/article/firstRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0000594.s001>)) (Ryu *et al.*, 2007); y Magnoni-2007 (extraído de [http://www.xlab.unimo.it/XLab/ExpData/Native\\_platform\\_file /raw\\_CEL\\_files.zip](http://www.xlab.unimo.it/XLab/ExpData/Native_platform_file/raw_CEL_files.zip)) (Magnoni *et al.*, 2007).

Los datos de líneas celulares de melanoma fueron extraídos de 4 series de líneas celulares que contenían: 35 líneas celulares en la serie Mannheim (GSE4843) y 26 líneas celulares en la serie Philadelphia (GSE4841) (Hoek *et al.*, 2006); 33 líneas celulares en la serie Johansson (GSE7127) (Johansson *et al.*, 2007); y 14 líneas celulares en la serie Wagner (GSE8332) (Wagner *et al.*, 2007).

La normalización de los datos se realizó con *GeneSpring GX 7.3* (Agilent Technologies) como se describió previamente (Hoek *et al.*, 2006). Brevemente, cada valor de *probe set* inferior a 0,01 se fijó en 0,01. Cada medida se dividió por la mediana de todas las medidas de esa muestra. Finalmente, cada medida se dividió por la mediana de sus mediciones en todas las muestras.

Cada conjunto de datos de líneas celulares de melanoma se normalizó y analizó por separado. Para la comparación de la expresión génica entre melanocitos primarios y líneas celulares de melanoma, se normalizaron a la vez el conjunto de datos de melanocitos y cada una de las series de líneas celulares de melanoma.

Para las series Mannheim, Philadelphia, Johansson y Wagner, la clasificación de las líneas celulares en los cohortes proliferativo e invasivo se llevó a cabo según se determinó previamente (Hoek *et al.*, 2006). El agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) de los perfiles de expresión de las líneas celulares clasificó a éstas en dos cohortes o grupos principales con perfil de expresión opuesto, A y C, y un cohorte B con un perfil de expresión intermedio y que no se consideró en las comparaciones posteriores (el término cohorte se emplea para definir un grupo de líneas celulares que tienen perfiles de expresión génica muy similares). A continuación, mediante análisis estadísticos se identificó una lista de 223 genes con patrones de expresión específicos de cada cohorte (Figura 11). Para identificar cuáles de estos genes estaban co-regulados y cómo estaban co-regulados con respecto a los cohortes, se utilizó un algoritmo de *clustering*, el análisis *self-organized map* (SOM). Este análisis reveló dos patrones o motivos principales de expresión de genes co-regulados: de los 223 genes comunes, 105 estaban fuertemente ligados a uno de los dos motivos o patrones distintos, y estos dos motivos eran suficientes para diferenciar los dos cohortes (el término motivo se refiere a un patrón de expresión compartido por un conjunto de genes cuya expresión está co-regulada). La expresión de los 51 genes co-regulados del motivo 1 disminuía en las líneas celulares del cohorte C con respecto a las líneas celulares del cohorte A, mientras que la expresión de los 54 genes co-regulados del motivo 2 aumentaba en las líneas celulares del cohorte C con respecto a las líneas celulares del cohorte A. Una revisión de la literatura reveló que los genes de cada uno de los motivos que identificaban a cada cohorte estaban relacionados funcionalmente con la capacidad proliferativa o con el potencial invasivo, respectivamente. Posteriormente, mediante ensayos funcionales de proliferación e invasión *in vitro* y análisis de expresión en biopsias de pacientes (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2006), se comprobó que las líneas celulares del cohorte proliferativo (cohorte A) presentaban una alta tasa proliferativa, eran sensibles a la inhibición de crecimiento por TGF $\beta$  y su capacidad invasiva era baja; en cambio, las líneas celulares del cohorte invasivo (cohorte C) tenían un alto potencial invasivo, pero su capacidad proliferativa era baja y eran insensibles a la acción de TGF $\beta$ . Como ya se ha comentado, las líneas celulares del cohorte B presentaban un fenotipo intermedio y no fueron consideradas para los análisis posteriores.



**Figura 11. Cohortes de líneas celulares de melanoma con perfil de expresión génica diferencial.** Se muestra el agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) de los perfiles de expresión génica de las líneas celulares de melanoma de las series Philadelphia y Mannheim en dos cohortes o grupos principales con perfil de expresión opuesto, A y C, y un cohorte B con un perfil de expresión intermedio. Los colores muestran la señal de intensidad normalizada de los 223 genes comunes en ambas series con un patrón de expresión específico de cada cohorte, representando el rojo la señal más alta y el verde la señal más baja (Hoek *et al.*, 2006).

Se determinó la señal de intensidad media normalizada de *PEDF* (*probe set 202283\_at*), y después se comparó su expresión entre los distintos grupos. Por un lado, se evaluaron las diferencias de expresión de *PEDF* entre melanocitos y líneas celulares de melanoma. Por otro lado, se analizaron las diferencias de expresión de *PEDF* entre los cohortes proliferativo e invasivo de líneas celulares de melanoma.

### 13. Ensayos de migración e invasión *in vitro*

Para evaluar la capacidad migratoria e invasiva de las células se utilizaron cámaras de Boyden modificadas (*transwell*) con filtros de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y 8  $\mu$ m de tamaño de poro (Costar). Para la migración, los filtros fueron cubiertos previamente durante 16 h con 0,5% gelatina (Gibco) en PBS. En el caso de la invasión, los filtros se cubrieron con 12,5  $\mu$ g de Matrigel (para las invasiones de melanocitos primarios) o Matrigel reducido en factores (para las invasiones de células de melanoma) (ambos de Becton Dickinson) diluido en 100  $\mu$ l de medio sin suero, y se dejaron secar toda la noche en la campana de flujo. Asimismo, las células estuvieron en ausencia de suero durante las 16 h previas a la migración. Se sembraron  $1,2 \times 10^5$  células resuspendidas en medio sin suero en la parte superior del filtro, mientras que en la parte inferior se pusieron los factores quimiotácticos correspondientes diluidos en 700  $\mu$ l de medio basal: 10% FBS; 30 ng/ml bFGF (Peprotech); 100 ng/ml IL8 (Peprotech); o 10-25  $\mu$ g/ml MC de células NIH-3T3.

Tras la incubación durante los periodos de tiempo indicados, se retiraron con un bastoncillo de algodón las células que no habían migrado/invadido, y los filtros se fijaron y tiñeron con Diff Quik (Dade Behring). Se contó el número de células que habían migrado/invadido en un microscopio con luz

visible a 40x aumentos en 10 áreas de máxima migración. Los valores medios  $\pm$  desviación estándar (DE) mostrados en las figuras son representativos de, al menos, tres experimentos independientes.

#### 14. Ensayo de crecimiento en agar blando

Este ensayo evalúa la capacidad de crecimiento de las células en ausencia de anclaje.

Se resuspendieron  $2,5 \times 10^4$  células en 0,35% agar Noble (BD Biosciences) diluido en RPMI 10% FBS y se sembraron sobre 0,5% agar Noble en el mismo medio en placas de cultivo de 6 pocillos. Se tomaron fotos de las colonias en el día 11 utilizando una lupa a 0,7x aumentos.

#### 15. Ensayo de *vasculogenic mimicry in vitro*

En este ensayo se analiza la capacidad de las células de melanoma de formar estructuras con forma de vasos (*vasculogenic mimicry*), propiedad sólo presente en células altamente agresivas (Hendrix *et al.*, 2003).

Se cubrieron pocillos de 2 cm<sup>2</sup> con 20  $\mu$ l de colágeno tipo I de cola de rata (BD Discovery Labware). Después se añadieron 30  $\mu$ l de etanol absoluto, y 5 min después 30  $\mu$ l de PBS. Tras 5 min de incubación se aspiró la mezcla PBS-etanol y se sembraron  $5 \times 10^5$  células resuspendidas en el medio de cultivo correspondiente sobre la matriz de colágeno y se dejaron crecer durante un máximo de 8 días.

#### 16. Ensayo de viabilidad celular

Para analizar la viabilidad celular se utilizó un ensayo basado en la metabolización mitocondrial de una sal, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma), que da lugar a un compuesto coloreado, el formazán. Se sembraron las células por cuadruplicado a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en placas multipocillo de 0,25 cm<sup>2</sup>. En los tiempos indicados se añadió el reactivo MTT, se incubó durante 4 h previamente a la solubilización con 0,01 M HCl en 10% SDS durante 16 h y la posterior cuantificación del producto coloreado en un espectrofotómetro Versa-Max a la longitud de onda 570 nm (formazán), y restando la absorción del plástico a 690 nm.

#### 17. Ensayo de proliferación celular mediante incorporación de EdU

La entrada en la fase de S del ciclo celular se analizó mediante la incorporación de 5-etinil-2-deoxiuridina (EdU) utilizando el kit *Click-iT EdU Imaging Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron  $8 \times 10^4$  células sobre cubreobjetos de cristal de 10 mm de diámetro en placas multipocillos de 2 cm<sup>2</sup>. Al día siguiente se lavaron dos veces y se incubaron durante 24 h en medio sin suero, tras las cuales se añadió 20  $\mu$ M EdU en medio sin suero o en medio con 10% FBS, y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, las células fueron fijadas y procesadas según las instrucciones del kit. Se contaron las células EdU positivas en seis campos diferentes en un microscopio confocal espectral TCS SP5 DMI6000 (Leica Microsystems) utilizando láseres de HeNe (633 nm) y diodo violeta (405 nm). Se contaron, al menos, un total de 500 núcleos por cada condición. Se empleó

el programa ImageJ (NIH, USA) para el conteo de las células sobre las imágenes digitales. Los valores medios  $\pm$  DE mostrados en las figuras son representativos de, al menos, dos experimentos independientes.

## 18. Ensayos de metástasis en modelos experimentales en ratón

### 18.1. Ensayo de colonización del pulmón por inyección de células tumorales en la vena de la cola

En el estudio de las propiedades malignas de las células tumorales *in vivo*, el modelo de inyección por la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos permite evaluar la agresividad de las células tumorales en relación con las últimas etapas del proceso metastásico: supervivencia en el torrente sanguíneo, extravasación, invasión y colonización de un órgano diana para formar nuevos focos tumorales.

Para analizar el efecto de PEDF en la capacidad de las células de melanoma de colonizar el pulmón, se utilizaron 5 ratones inmunodeprimidos NOD/SCID (Harlan Laboratories) por grupo a los que se inyectaron las líneas celulares de melanoma correspondientes resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS (Tabla 6).

Al finalizar el experimento (Tabla 6) los animales fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones, que se analizaron en un *Olympus OV100 Small Animal Imaging System* (Olympus Corp.) bajo luz a 490 nm para detectar la fluorescencia verde (GFP) emitida por las células de melanoma. Las metástasis superficiales de todo el pulmón fueron contadas manualmente. A continuación, se fijaron los pulmones en formalina, se embebieron en parafina y fueron seccionados para análisis posteriores.

**Tabla 6. Ensayo de colonización de pulmón: líneas celulares, número de células inyectadas y duración del ensayo.**

Línea celular	Número de células inyectadas	Duración del ensayo (días)
SBcl2-NS	$1 \times 10^6$	92
SBcl2-shPEDF	$1 \times 10^6$	92
C81-61-NS	$1 \times 10^6$	21
C81-61-shPEDF	$1 \times 10^6$	21
C8161-GFP	$1 \times 10^5$	28
C8161-PEDF	$1 \times 10^5$	28

### 18.2. Ensayo de formación de metástasis espontáneas a partir de un tumor primario subcutáneo

La mayoría de las líneas celulares de melanoma humano no forman metástasis espontáneas cuando se implantan subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (Fidler, 1986; Fidler *et al.*, 1984; Giovanella and Fogh, 1985; Sordat *et al.*, 1982). Esta dificultad ha restringido seriamente el uso de



xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos para el estudio de metástasis humanas, favoreciendo la utilización del modelo más permisivo de formación de metástasis tras inyección en la vena de la cola de ratones (descrito en el apartado anterior) que, sin embargo, no permite evaluar los primeros pasos en el proceso metastásico, como la invasión desde la lesión primaria y la intravasación. No obstante, en los últimos años se han identificado unas pocas líneas celulares de melanoma humano altamente agresivas capaces de dar lugar a metástasis espontáneas en un tiempo razonable, como las líneas celulares C8161 (Welch *et al.*, 1991), LOX (Yang *et al.*, 1999) y 113/6-4L (Cruz-Munoz *et al.*, 2008).

Para analizar el efecto de PEDF en la capacidad de líneas celulares de melanoma de formar metástasis espontáneas en ratones inmunodeprimidos, se inyectaron las células de melanoma subcutáneamente en el flanco derecho de ratones *nude* (Harlan Laboratories). El número de células inyectadas fue:  $1 \times 10^6$  células/flanco para las líneas celulares C8161-GFP y C8161-PEDF; y  $2 \times 10^6$  células/flanco para las líneas celulares C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Se inyectaron 10 ratones por grupo, y se dejaron crecer los tumores durante 4 semanas (ratones inyectados con células C8161-GFP y C8161-PEDF) o 9 semanas (ratones inyectados con células C81-61-NS y C81-61-shPEDF). Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los pulmones y los hígados, que se lavaron con PBS y se analizaron en un *Olympus OV100 Small Animal Imaging System* (Olympus Corp.) bajo luz a 490 nm para detectar la fluorescencia verde (GFP) emitida por las células de melanoma. Las metástasis superficiales de todo el pulmón fueron contadas manualmente sobre las imágenes digitales utilizando el programa MetaMorph.

## 19. Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa informático GraphPad InStat (GraphPad Software). Se compararon los valores medios de dos grupos mediante el test de Student (t-test) no pareado de dos colas, el test de Student no pareado de dos colas con corrección de Welch o el test no paramétrico de Mann-Whitney (estos dos últimos en las comparaciones en las que los datos no se ajustaban a distribuciones normales o que las desviaciones estándar no eran iguales). Cuando se compararon simultáneamente más de dos valores medios, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con una comparación múltiple *post-test* Tukey-Kramer. Los valores de probabilidad (p) iguales o inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).



## **RESULTADOS**



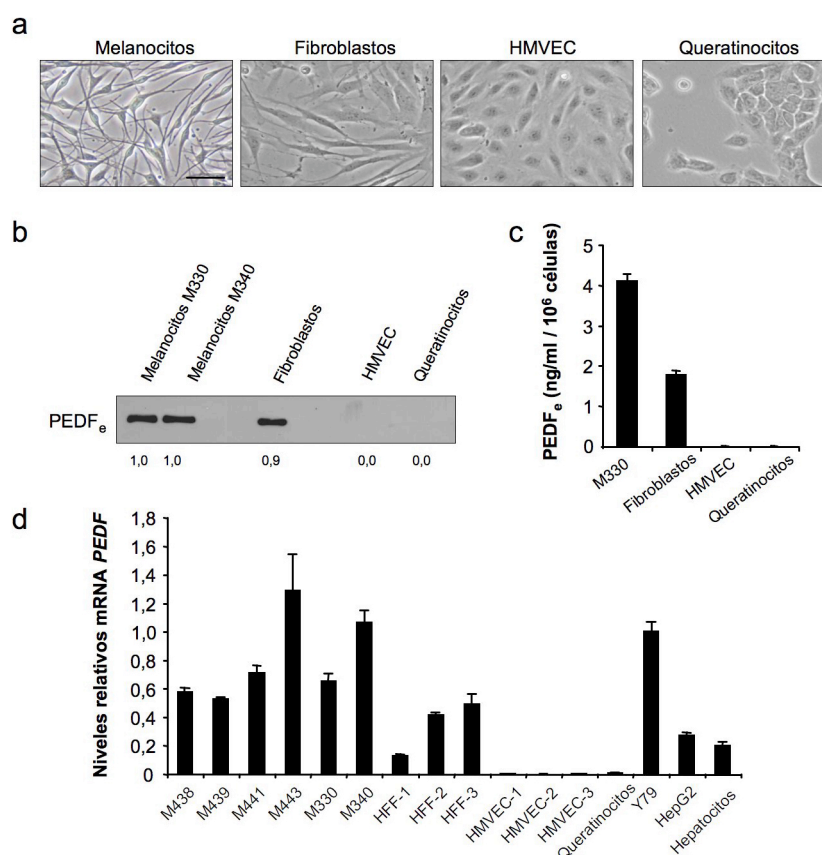
## 1. PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PEDF EN LA PROGRESIÓN MALIGNA DEL MELANOMA HUMANO. IMPLICACIONES FUNCIONALES

Como se ha comentado anteriormente, PEDF es una proteína multifuncional que se expresa de forma endógena en diversos tipos celulares. Aunque inicialmente fue caracterizado como un factor neurotrófico y neurodiferenciador, posteriormente se puso de manifiesto su potente actividad inhibidora de angiogénesis (Fernández-García *et al.*, 2007). En los últimos años, diversos estudios han mostrado la potente actividad antitumoral de PEDF en diversos tipos de cáncer, entre ellos el melanoma. En particular, nuestro laboratorio contribuyó a determinar aspectos esenciales del mecanismo de acción antitumoral de PEDF (García *et al.*, 2004), poniendo de manifiesto que el efecto antitumoral de PEDF se basa en una acción dual sobre la vascularización del tumor y sobre diversas propiedades funcionales de las propias células tumorales que determinan la agresividad del tumor (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha descrito la pérdida de la expresión de PEDF durante la progresión maligna de diversos tipos de cáncer, existiendo una correlación inversa entre los niveles de PEDF y el estadio y el potencial metastásico (Fernández-García *et al.*, 2007).

De este modo, teniendo en cuenta que el melanoma es un tumor que se desarrolla a partir de los melanocitos, y que PEDF es un factor con un potente efecto antitumoral cuya expresión se pierde en la progresión tumoral; estudiamos la expresión de PEDF en los melanocitos y en la progresión maligna del melanoma, y evaluamos las consecuencias funcionales de la ausencia de PEDF.

### 1.1. PEDF se produce a niveles elevados en los melanocitos de la piel

Puesto que el melanoma se origina a partir de la transformación maligna de los melanocitos, evaluamos la expresión de PEDF en cultivos primarios de melanocitos y otros tipos celulares de la piel (Figura 12a). El análisis por *Western blot* y ELISA de MC mostró que los melanocitos y fibroblastos de la piel expresaban niveles similarmente altos de PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>), mientras que este factor era indetectable en células endoteliales microvasculares y en queratinocitos (Figuras 12b y 12c). Este resultado fue confirmado también a nivel de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 12d), que mostró que los melanocitos expresaban 476 y 126 veces más mRNA de *PEDF* que las células endoteliales o los queratinocitos, respectivamente (Figura 12d). Además, como comparación se incluyeron controles positivos de alta expresión de PEDF, como la línea celular de retinoblastoma Y79 (Seigel *et al.*, 1994), la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 y hepatocitos primarios (Sawant *et al.*, 2004), y observamos que los melanocitos expresaban comparativamente niveles elevados de PEDF.



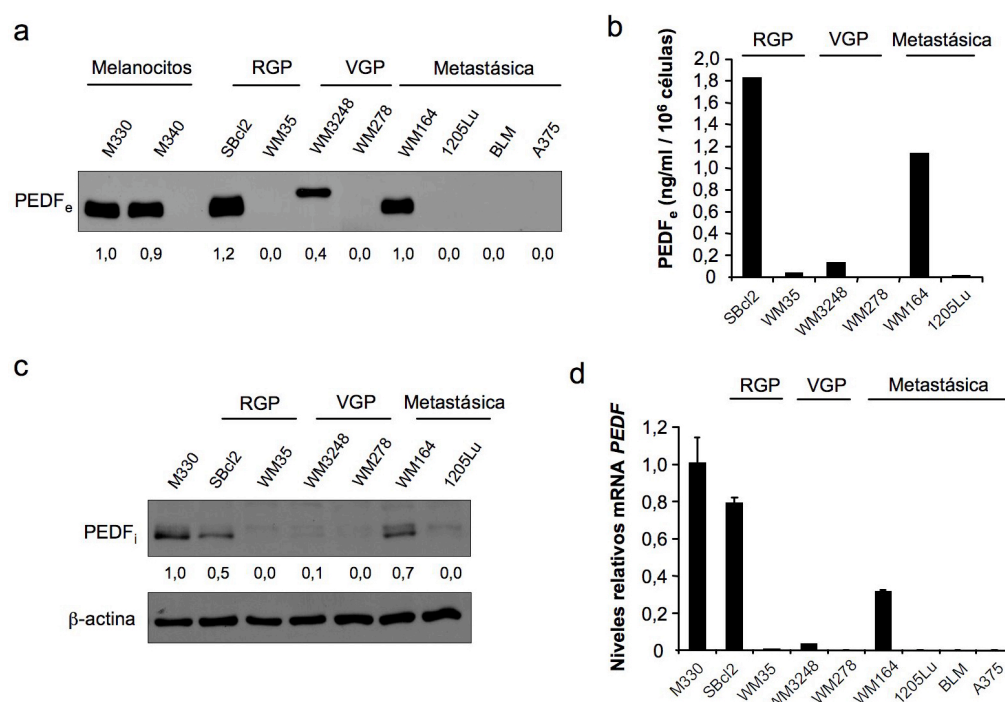
**Figura 12. Expresión de PEDF en cultivos primarios de diferentes tipos celulares de la piel.** (a) Micrografías de contraste de fases de cultivos primarios de melanocitos, fibroblastos, células endoteliales microvasculares (HMVEC) y queratinocitos. Barra de escala, 50  $\mu$ m. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de cultivos primarios humanos de melanocitos (M330 and M340), fibroblastos, células endoteliales microvasculares (HMVEC) y queratinocitos. Los números debajo de la imagen muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos. (c) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular en MC de 24 h de cultivos primarios humanos de melanocitos (M330), fibroblastos, HMVEC y queratinocitos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE). (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en cultivos primarios humanos de melanocitos (M438, M439, M441, M443, M330, M340), fibroblastos (HFF1, HFF2, HFF3), células endoteliales (HMVEC1, HMVEC2, HMVEC3), queratinocitos, línea celular de retinoblastoma Y79, línea celular de hepatocarcinoma HepG2 y hepatocitos. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de Y79 tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

## 1.2. La expresión de PEDF se pierde en los melanomas muy invasivos

Diversos estudios han mostrado la pérdida de expresión de PEDF durante la progresión maligna de varios tipos de cáncer, como adenocarcinoma de próstata, páncreas y mama, entre otros (Fernández-García *et al.*, 2007). Para comprobar si la expresión de PEDF también está modulada durante la génesis y progresión del melanoma, analizamos los niveles de expresión de PEDF en una pequeña serie de líneas celulares de melanoma cutáneo humano establecidas a partir de lesiones en fase de crecimiento radial (RGP); en fase de crecimiento vertical (VGP); o de metástasis (M) de melanoma cutáneo humano.

El *Western blot* de MC mostró que mientras que algunas líneas celulares RGP y VGP expresaban niveles de PEDF extracelular similares a los de los melanocitos primarios, la mayoría de las

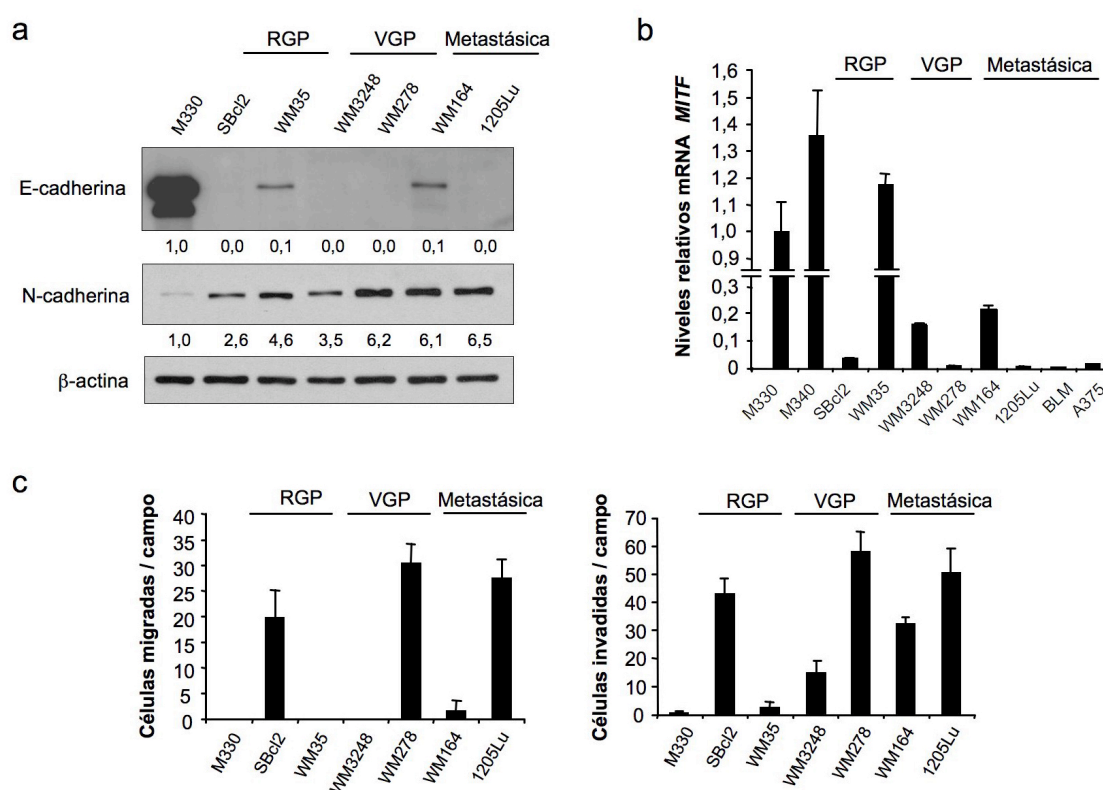
líneas celulares derivadas de metástasis no expresaba PEDF (Figura 13a). Estos datos fueron confirmados por ELISA de MC (Figura 13b) y correlacionaban con los niveles de proteína PEDF intracelulares (PEDF<sub>i</sub>) (Figura 13c) y con los niveles de mRNA de *PEDF* (Figura 13d). Al comparar melanocitos primarios frente a líneas celulares de melanoma, la media de los niveles de mRNA de *PEDF* determinada en melanocitos primarios de 6 donadores diferentes era 24 veces más alta que la media de nuestra colección de 10 líneas celulares de melanoma ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, excepcionalmente algunas líneas celulares derivadas de metástasis mantenían niveles elevados de PEDF, como la línea celular WM164 (Figura 13).



**Figura 13. Expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma RGP, VGP y derivadas de metástasis en comparación con melanocitos humanos normales.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de melanocitos primarios M330 y M340; líneas celulares establecidas a partir de biopsias de: melanoma radial (RGP) SBcl2 y WM35; melanoma vertical (VGP) WM3248 y WM278; y metástasis de melanoma WM164, 1205Lu, BLM y A375. Los números debajo de la imagen muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos M330. (b) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 y 1205Lu. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (c) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) en extractos celulares de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 y 1205Lu. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos tras corregir por la carga. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en melanocitos primarios M330 y M340 y en las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164, 1205Lu, BLM y A375. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de los melanocitos tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Con el objetivo de profundizar en la posible asociación entre la pérdida de expresión de PEDF y la agresividad del melanoma, analizamos la correlación de los niveles de PEDF con la expresión de marcadores moleculares (E-cadherina (Li *et al.*, 2001b); N-cadherina (Li *et al.*, 2001a); y factor de

transcripción asociado a microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*, *MITF*) (Carreira *et al.*, 2006)) y funcionales (capacidad migratoria e invasiva) de la progresión del melanoma (Figura 14). Respecto a las líneas celulares WM3248 (VGP) y WM164 (derivada de metástasis), ambas expresaban PEDF y mantenían la expresión de E-cadherina o *MITF*, lo que concuerda con su bajo potencial migratorio e invasivo. Sin embargo, esta correlación no se observaba en las líneas celulares RGP. La línea celular WM35 no expresaba PEDF pero mantenía la expresión de E-cadherina y *MITF* y presentaba una capacidad migratoria e invasiva muy pobre. En cambio, la línea celular SBcl2 presentaba niveles elevados de PEDF a pesar de su alta capacidad migratoria e invasiva, de acuerdo con su pérdida de E-cadherina y *MITF*. Por lo tanto, este análisis no nos permitió establecer una correlación sólida entre los niveles de expresión de PEDF y los marcadores moleculares y criterios funcionales que elegimos para definir la agresividad de las líneas celulares de melanoma utilizadas.



**Figura 14. Caracterización molecular y funcional de líneas celulares de melanoma RGP, VGP y derivadas de metástasis con expresión diferencial de PEDF.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína E-cadherina y N-cadherina en extractos celulares de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 y 1205Lu. Se usó β-actina como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos tras corregir por la carga. (b) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *MITF* en melanocitos primarios M330 y en las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164, 1205Lu, BLM y A375. Se muestran los niveles de mRNA de *MITF* relativos a los de los melanocitos tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media ± DE. (c) Ensayos de migración (panel izquierdo) e invasión (panel derecho) de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma en los diferentes estadios histopatológicos SBcl2, WM35, WM3248, WM278, WM164 y 1205Lu frente a 10% FBS durante 8 h (migración) o 24 h (invasión).



Teniendo en cuenta la variabilidad de la expresión de PEDF en nuestra serie inicial de líneas celulares, así como la dificultad en la clasificación del melanoma, consideramos necesario ampliar nuestro análisis a series más grandes de líneas celulares para determinar una tendencia más clara en los niveles de expresión de PEDF durante la progresión del melanoma. Para ello utilizamos un análisis global de datos procedentes de estudios de *microarrays* de melanoma disponibles en bases de datos como GEO y otras, que incluyen series grandes de líneas celulares de melanoma humano. Los datos mostrados se refieren al análisis de las siguientes series: Mannheim (Hoek *et al.*, 2006), Philadelphia (Hoek *et al.*, 2006), Johansson (Johansson *et al.*, 2007) y Wagner (Wagner *et al.*, 2007).

En primer lugar analizamos las diferencias en la expresión de PEDF entre melanocitos y el conjunto total de líneas celulares de melanoma en cada serie; se comparó la media de expresión normalizada de *PEDF* de 28 cultivos primarios independientes de melanocitos frente a la media de expresión normalizada en cada serie de líneas celulares de melanoma. En la Tabla 7a se muestra que había una reducción consistente y estadísticamente significativa de la expresión de *PEDF* en las cuatro colecciones de líneas celulares de melanoma con respecto al grupo de los melanocitos.

Como se ha comentado previamente, la naturaleza heterogénea del melanoma, así como la dificultad para clasificarlo han promovido en los últimos años diversos estudios de análisis de expresión génica global mediante *microarrays* que pretenden realizar una clasificación molecular de los melanomas (Fecher *et al.*, 2007; Hoek, 2007). Utilizando un análisis global de la expresión génica en series grandes de líneas celulares de melanoma establecidas a partir de biopsias de pacientes en diversos estadios, Hoek y colaboradores identificaron firmas de expresión molecular que diferenciaban dos cohortes o grupos principales entre las líneas celulares de melanoma (Figura 11) (Hoek *et al.*, 2006). Mediante una revisión de la literatura observaron que los conjuntos de genes co-regulados que identificaban los cohortes definidos por agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) se correspondían funcionalmente con perfiles proliferativos o invasivos, respectivamente. Posteriormente, mediante ensayos de proliferación e invasión *in vitro* y análisis de expresión en biopsias de pacientes (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2008; Hoek *et al.*, 2006) comprobaron que las líneas celulares del cohorte proliferativo presentaban un fenotipo de alta proliferación y baja capacidad invasiva, mientras que en el cohorte invasivo las líneas celulares eran poco proliferativas pero altamente invasivas.

De este modo, aplicamos estos criterios de clasificación a las cuatro series de líneas celulares de melanoma anteriormente descritas y analizamos la expresión de *PEDF* en cada uno de los cohortes. En la Figura 15 se observa que los niveles de expresión de *PEDF* eran inferiores en el cohorte invasivo de todas las series; asimismo, esta disminución era estadísticamente significativa en las series de Mannheim y Philadelphia (Tabla 7b)

**Tabla 7. Diferencias en la expresión de PEDF entre melanocitos y colecciones de líneas celulares de melanoma y dentro de colecciones de líneas celulares de melanoma****a. Diferencias en la expresión de PEDF entre melanocitos y colecciones de líneas celulares de melanoma**

Conjunto de datos	Media	Desviación estándar	Factor	Test estadístico
Melanocitos	3,58	3,25		
Mannheim	1,45	1,98	2,48	Mann-Whitney, $p < 0,001$
Melanocitos	3,44	3,13		
Philadelphia	0,84	1,22	4,10	Mann-Whitney, $p < 0,0001$
Melanocitos	5,47	4,97		
Johansson	2,63	5,03	2,08	Mann-Whitney, $p < 0,0001$
Melanocitos	2,27	2,06		
Wagner	0,61	0,82	3,75	Mann-Whitney, $p < 0,001$

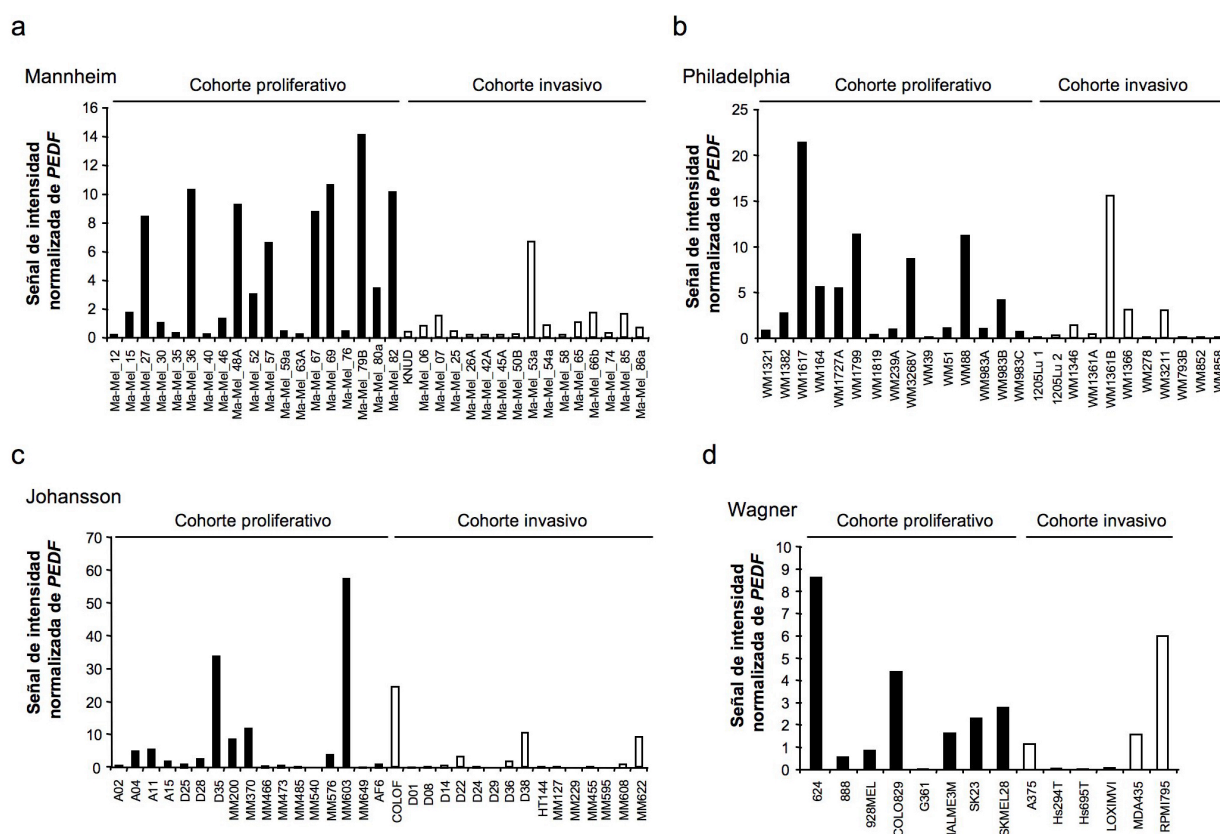
Nota: mientras que “Melanocitos” se refiere a la misma colección de cultivos en todos los casos, la medida de expresión normalizada de los melanocitos se ve afectada por los datos de la serie de líneas celulares de melanoma con la que se normaliza; por lo tanto el valor medio de expresión para PEDF de los melanocitos no se espera que sea el mismo para cada comparación.

**b. Diferencias en la expresión de PEDF entre los cohortes proliferativo e invasivo de líneas celulares de melanoma**

Conjunto de datos	Proliferativo		Invasivo		Factor	Test estadístico
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar		
Mannheim	4,74	4,67	1,05	1,59	4,50	Mann-Whitney, $p < 0,05$
Philadelphia	4,99	5,94	2,16	4,58	2,31	Mann-Whitney, $p < 0,05$
Johansson	8,21	15,48	3,11	6,27	2,64	Mann-Whitney, no significativo ( $p = 0,14$ )
Wagner	2,65	2,79	1,48	2,31	1,78	t-test, no significativo ( $p = 0,42$ )

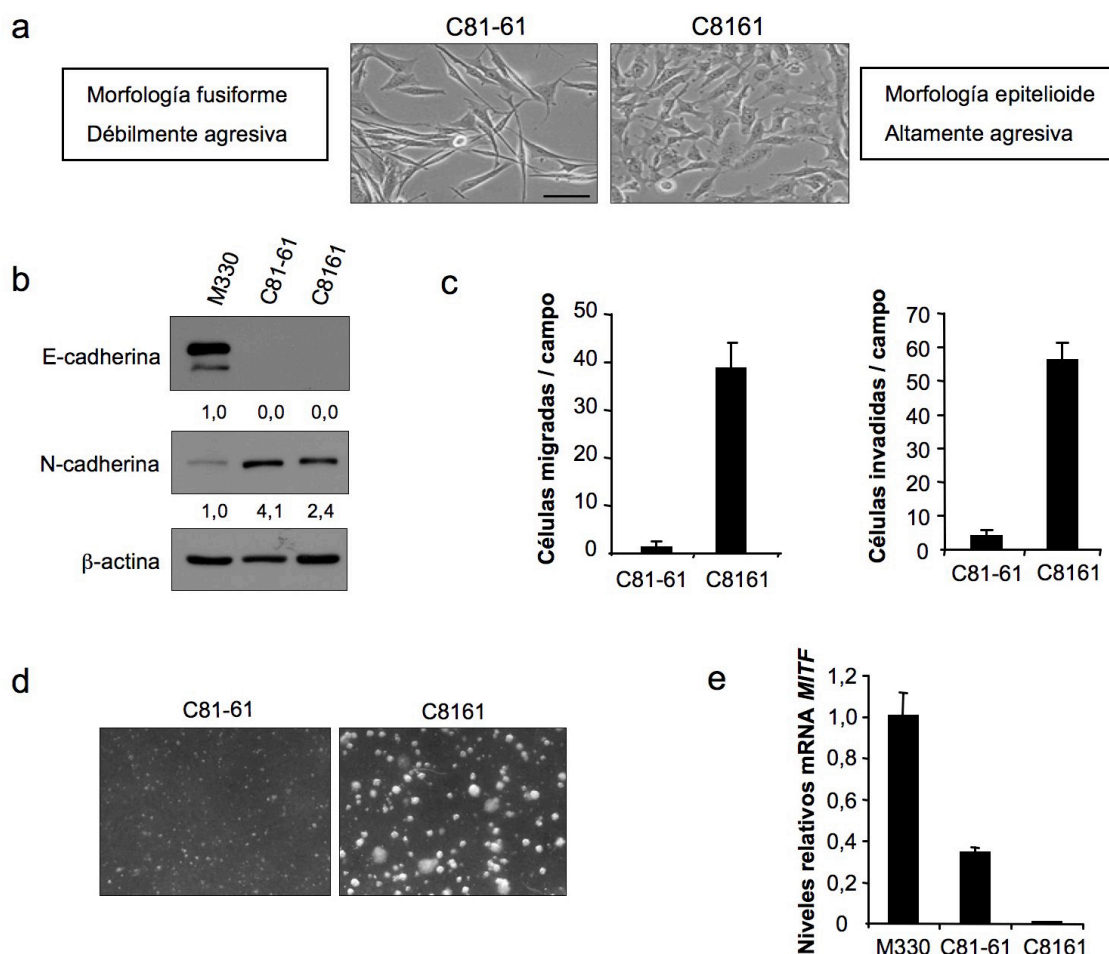
### 1.3. La expresión de PEDF se puede reprogramar durante la progresión maligna del melanoma humano

En nuestro análisis inicial en líneas celulares de melanoma clasificadas por criterios histopatológicos encontramos que, a pesar de la tendencia observada hacia la pérdida de expresión de PEDF en las líneas celulares derivadas de metástasis de melanoma, excepcionalmente algunas líneas celulares derivadas de metástasis mantenían niveles significativos de expresión de PEDF. Teniendo en cuenta la heterogeneidad del melanoma así como el fenómeno de reprogramación epigenética que ocurre en las metástasis (Hendrix *et al.*, 2003), nos preguntamos si, por un lado, la expresión de PEDF se reprograma durante el proceso de metástasis; y, por otro lado, si dentro de una misma lesión metastásica la expresión elevada de PEDF es característica de la subpoblación débilmente agresiva.



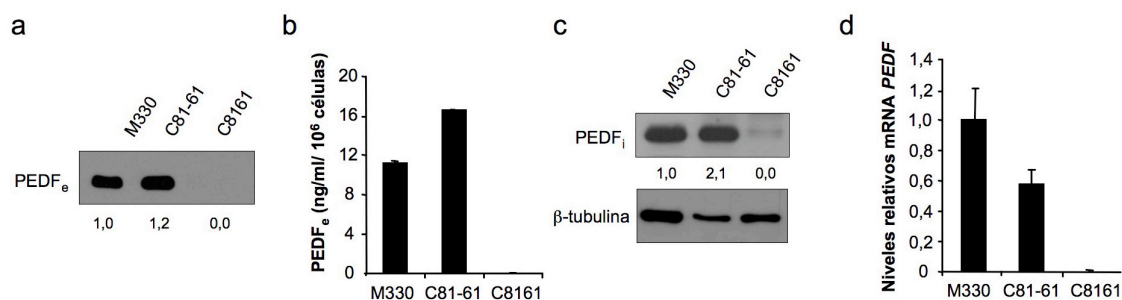
**Figura 15. Expresión de *PEDF* en series de líneas celulares de melanoma de estudios globales de expresión génica mediante *microarrays* disponibles en bases de datos.** Análisis de la expresión de *PEDF* utilizando datos de expresión génica de *microarrays* de las series de líneas celulares de melanoma Mannheim (a), Philadelphia (b), Johansson (c) y Wagner (d). Las líneas celulares fueron clasificadas por su perfil de expresión génica en los cohortes proliferativo (barras negras) e invasivo (barras blancas) según se describe en Materiales y Métodos. Se representa la señal de intensidad normalizada de *PEDF* de cada serie. Los valores medios y de DE y los análisis estadísticos se describen en la Tabla 7b.

Para verificar estas hipótesis, utilizamos una pareja de líneas celulares con fenotipos extremos (débil y altamente agresivo), derivadas de una metástasis de un melanoma cutáneo humano en la pared abdominal, y que han sido ampliamente caracterizadas (Seftor *et al.*, 2005; Topczewska *et al.*, 2006). La Figura 16a muestra las diferencias morfológicas entre las dos líneas celulares: la débilmente agresiva C81-61 era fusiforme y alargada, mientras que la muy agresiva C8161 presentaba morfología epitelioides. A pesar de que ambas líneas expresaban N-cadherina y habían perdido la expresión de E-cadherina (Figura 16b), su comportamiento difería significativamente al evaluar diversas características funcionales. De este modo, la capacidad migratoria e invasiva de la línea celular C81-61 era muy inferior (Figura 16c), y apenas crecía en agar blando (Figura 16d); de acuerdo con esto, los niveles de mRNA de *MITF* de la línea celular C81-61 eran muy superiores a los de la C8161 (Figura 16e).

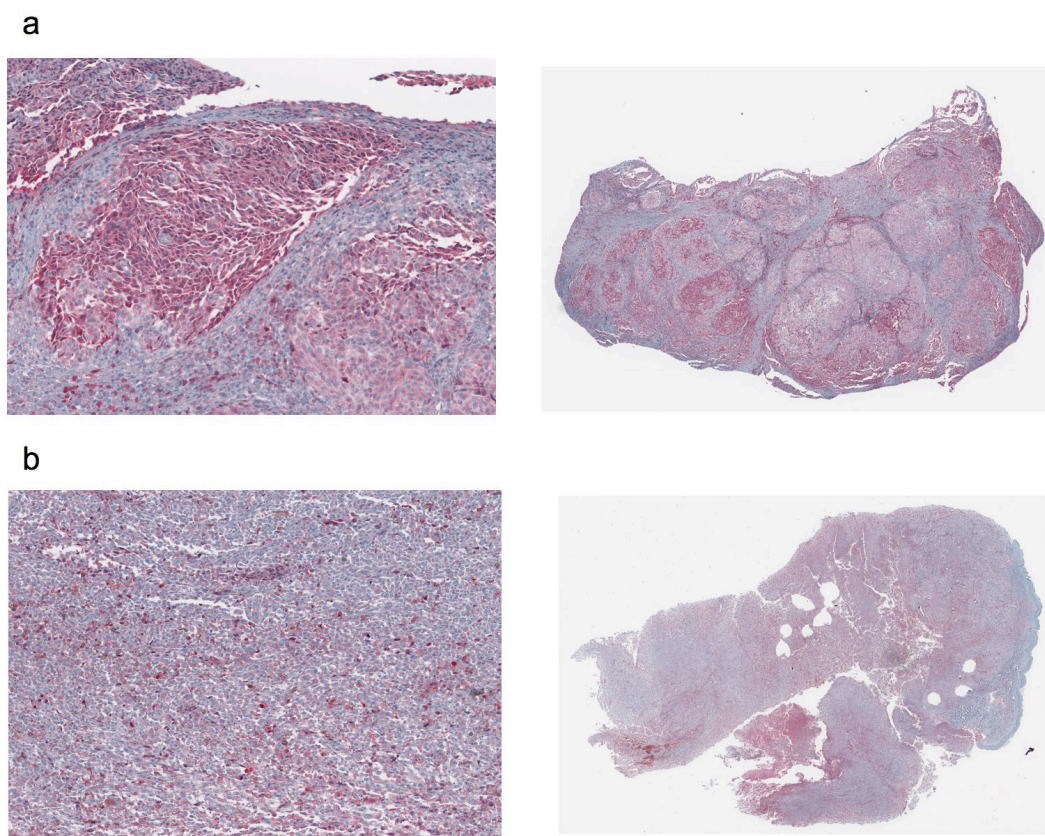


**Figura 16. Caracterización molecular y funcional de líneas celulares de melanoma con fenotipos extremos (débil y altamente agresivo) derivadas de una metástasis de un melanoma cutáneo humano en la pared abdominal.** (a) Micrografías de contraste de fases de las líneas celulares de melanoma C81-61 (poco agresiva) y C8161 (muy agresiva). Barra de escala, 50  $\mu$ m. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína E-cadherina y N-cadherina en extractos celulares de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos tras corregir por la carga. (c) Ensayos de migración (panel izquierdo) e invasión (panel derecho) de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161 frente a 10% FBS durante 8 h (migración) o 24 h (invasión). (d) Imágenes de contraste de fases de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161 creciendo en agar blando tras 11 días de cultivo. Aumentos, 0,7 $\times$ . (e) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *MITF* en melanocitos primarios M330 y en las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Se muestran los niveles de mRNA de *MITF* relativos a los de los melanocitos tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Sorprendentemente, al analizar la expresión de PEDF observamos que la línea celular poco agresiva C81-61 expresaba niveles elevados de PEDF similares a los de los melanocitos primarios, mientras que PEDF era indetectable en la muy agresiva C8161, dato que se comprobó mediante *Western blot* (Figura 17a) y ELISA (Figura 17b) de MC y por *Western blot* de extractos celulares (Figura 17c). De igual manera, los niveles de mRNA de *PEDF* eran elevados en la línea celular poco agresiva C81-61 pero indetectables en la muy agresiva C8161 (Figura 17d)



**Figura 17. Expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma con fenotipos extremos (débil y altamente agresivo) derivadas de una metástasis de un melanoma cutáneo humano en la pared abdominal.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos. (b) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular en MC de 48 h de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (c) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF intracelular (PEDF<sub>i</sub>) en extractos celulares de melanocitos primarios M330 y de las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Se usó  $\beta$ -tubulina como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de los melanocitos tras corregir por la carga. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en melanocitos primarios M330 y en las líneas celulares de melanoma poco agresiva C81-61 y muy agresiva C8161. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de los melanocitos tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.



**Figura 18. Expresión de PEDF en biopsias de metástasis de melanoma.** Se muestra la detección mediante inmunohistoquímica de PEDF en biopsias de metástasis de melanoma en nódulo linático (a) y en dermis (b). Los paneles de la izquierda muestran una zona representativa (a 40 $\times$  aumentos) de toda la sección (paneles de la derecha).

Para comprobar si la heterogeneidad de la expresión de PEDF en líneas celulares establecidas a partir de lesiones de metástasis de melanoma ocurría también en las lesiones tumorales, analizamos biopsias de metástasis de melanoma humano en nódulo linfático y metástasis en dermis mediante inmunohistoquímica. Se observó que la expresión de PEDF era muy positiva sólo en una de cada cinco biopsias de ambos tipos de metástasis, confirmando la tendencia a la pérdida de expresión de PEDF en las metástasis de melanoma. Además, las biopsias positivas mostraban un patrón de tinción de PEDF heterogéneo (Figura 18).

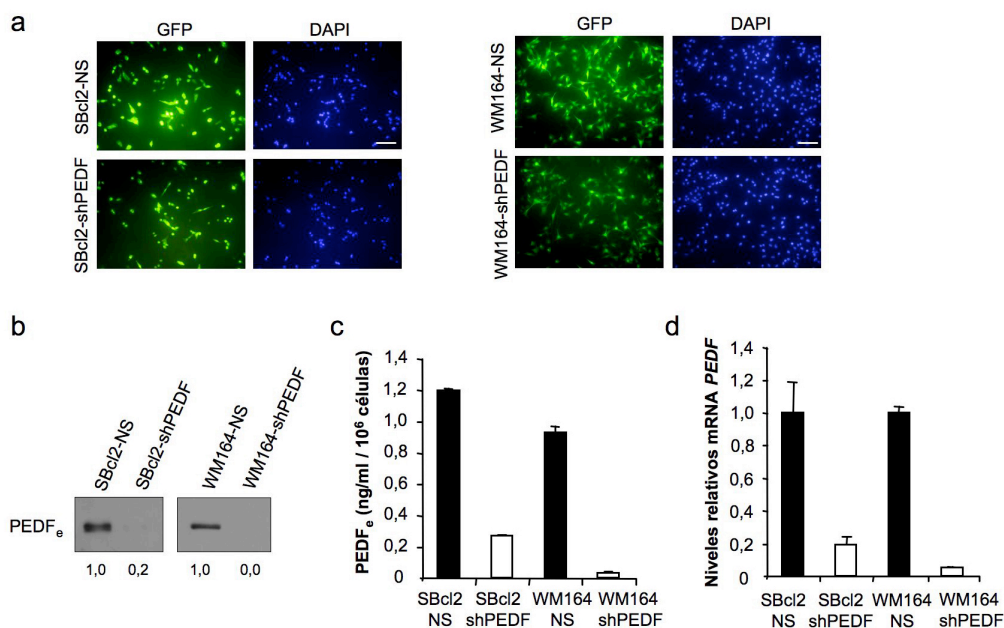
#### **1.4. PEDF modula el potencial metastásico del melanoma mediante sus efectos directos en la capacidad migratoria e invasiva y en la plasticidad de las células de melanoma**

Hasta ahora, los distintos abordajes que hemos empleado para analizar la expresión de PEDF en la progresión del melanoma nos han permitido determinar, de forma correlativa, que existe una tendencia hacia la pérdida de expresión de PEDF en los melanomas muy agresivos e invasivos. Por ello, para establecer una relación causal entre los niveles de PEDF y la agresividad e invasividad del melanoma, evaluamos las consecuencias funcionales del silenciamiento de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma débilmente agresivas en las que, como hemos mostrado, se mantienen niveles significativos de expresión de PEDF.

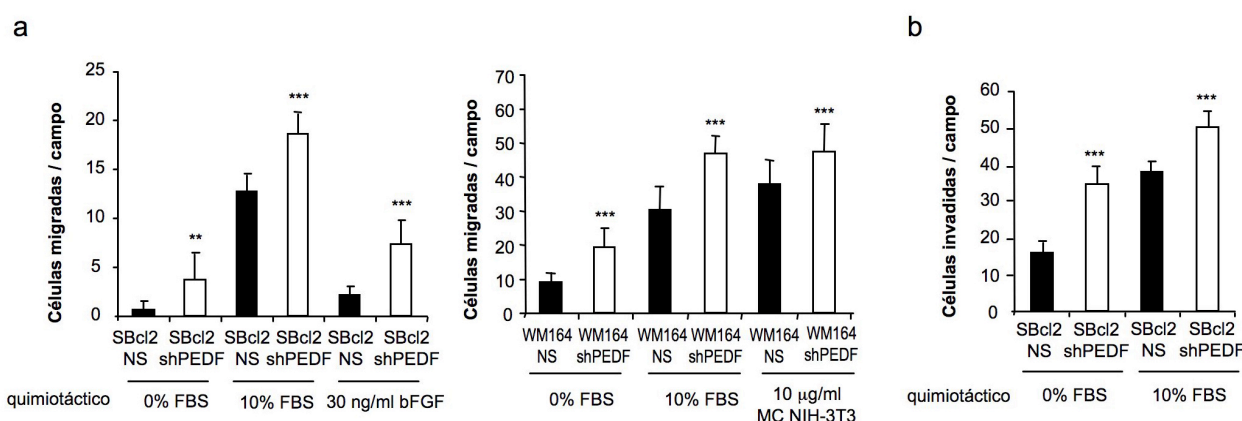
De este modo, interferimos la expresión de PEDF en las líneas celulares de melanoma poco agresivas SBcl2 y WM164 introduciendo un shRNA<sup>mir</sup> específico de PEDF (shPEDF) mediante transducción lentiviral; asimismo, como control utilizamos un shRNA<sup>mir</sup> sin homología con ningún gen conocido de mamíferos (NS) (Figura 19a). Se cuantificó el silenciamiento de la expresión de PEDF mediante *Western blot* (Figura 19b) y ELISA (Figura 19c) de MC y mediante RT-PCR cuantitativa, siendo el porcentaje de silenciamiento del mRNA de *PEDF* del 81% en la línea celular SBcl2 y del 95% en la línea celular WM164 (Figura 19d).

Al evaluar las propiedades migratorias de las células, se observó que el silenciamiento de PEDF aumentaba significativamente la migración basal e inducida frente a distintos factores quimiotácticos (suero, bFGF o MC de células NIH3T3) en las células SBcl2 y WM164 (Figura 20a). Asimismo, la capacidad invasiva de las células SBcl2 también se veía incrementada tras el silenciamiento de PEDF (Figura 20b).



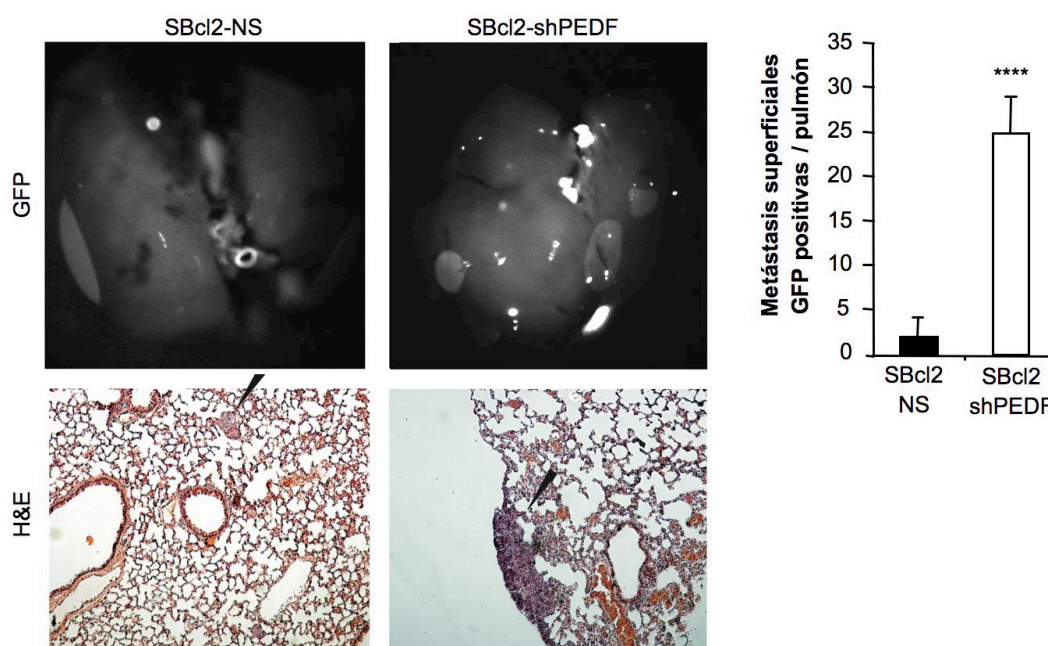


**Figura 19. Silenciamiento de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas.** (a) Eficiencia de transducción de las líneas celulares de melanoma SBcl2 (izquierda) y WM164 (derecha) tras la infección con lentivirus control no interferente (NS) o interferente para PEDF (shPEDF) a una MOI de 10 (SBcl2) o 60 (WM164). Las imágenes de fluorescencia muestran que más del 95% de células son GFP positivas. Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI. Barras de escala, 150  $\mu$ m. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS y SBcl2-shPEDF (izquierda) y WM164-NS y WM164-shPEDF (derecha). Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de las líneas celulares NS. (c) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF, WM164-NS y WM164-shPEDF. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS, SBcl2-shPEDF, WM164-NS y WM164-shPEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de las líneas celulares NS tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.



**Figura 20. El silenciamiento de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas aumenta la migración e invasión celulares.** (a) Ensayos de migración de las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS y SBcl2-shPEDF (izquierda) y WM164-NS y WM164-shPEDF (derecha) frente a medio sin suero o medio con 10% FBS, 30 ng/ml bFGF o 10  $\mu$ g/ml MC de células NIH-3T3 durante 8 h (SBcl2) o 16 h (WM164). Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). (b) Ensayos de invasión de las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS y SBcl2-shPEDF frente a 10% FBS durante 24 h. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Dado que la migración e invasión son propiedades funcionales estrictamente necesarias para la formación de metástasis, nos preguntamos si el aumento en la capacidad migratoria e invasiva como consecuencia de la interferencia de PEDF se traducía en un aumento en el potencial metastásico *in vivo*. De este modo, evaluamos la habilidad de las células SBcl2 control (SBcl2-NS) e interferentes para PEDF (SBcl2-shPEDF) de formar colonias metastásicas en el pulmón tras ser inyectadas en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos. Observamos que los pulmones de los ratones inyectados con células SBcl2-shPEDF presentaban un número significativamente mayor de colonias metastásicas GFP positivas que los ratones inyectados con las células control SBcl2-NS (Figura 21, paneles superiores en la parte de la izquierda). Asimismo, el análisis histológico de secciones de los pulmones confirmó la presencia de metástasis de mayor tamaño en los pulmones de ratones inyectados con células SBcl2-shPEDF (Figura 21, paneles inferiores en la parte la izquierda). La parte superior derecha de la Figura 21 muestra la cuantificación del número de metástasis superficiales GFP positivas en los pulmones de ratones inyectados con células SBcl2-NS o SBcl2-shPEDF.

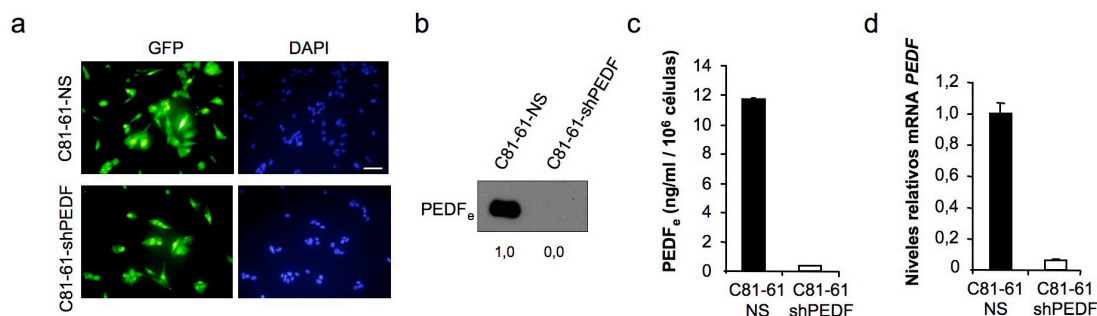


**Figura 21. El silenciamiento de PEDF en líneas celulares de melanoma débilmente agresivas aumenta el potencial metastásico.** Ensayo de colonización de pulmón de las líneas celulares de melanoma SBcl2-NS y SBcl2-shPEDF. Las metástasis en pulmón se detectaron mediante fluorescencia. Se muestran imágenes de fluorescencia de los pulmones (paneles superiores de la parte izquierda) y la cuantificación de las metástasis superficiales (panel superior de la parte derecha). Las barras representan la media  $\pm$  DE, y los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ). Los paneles inferiores muestran tinciones con H&E de secciones de los pulmones, y las metástasis microscópicas se señalan con flechas negras. Aumentos, 10 $\times$ .

Por otro lado, también analizamos las consecuencias funcionales del silenciamiento de PEDF en la línea celular de melanoma poco agresiva C81-61. A pesar de que el grado de interferencia de



PEDF fue óptimo (94% según RT-PCR cuantitativa) (Figura 22), no se observó un aumento en la capacidad migratoria de estas células (datos no mostrados).

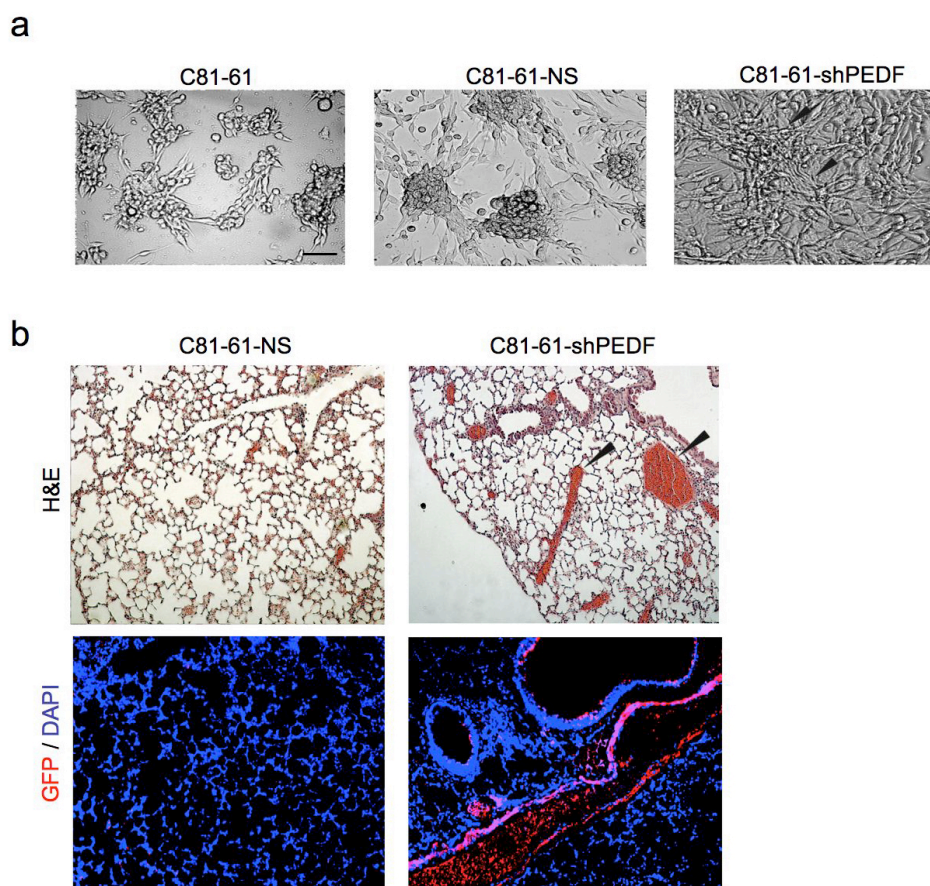


**Figura 22. Silenciamiento de PEDF en la línea celular de melanoma poco agresiva C81-61.** (a) Eficiencia de transducción de la línea celular de melanoma C81-61 tras la infección con lentivirus no interferente (NS) o interferente para PEDF (shPEDF) a una MOI de 40. Las imágenes de fluorescencia muestran que más del 95% de células son GFP positivas. Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI. Barra de escala, 75  $\mu$ m. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Los números debajo de la imagen muestran la cuantificación relativa a la expresión de la línea celular C81-61-NS. (c) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de la línea celular C81-61-NS tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Como se ha comentado previamente, las células de melanoma presentan una alta plasticidad y la capacidad para ser reprogramadas dependiendo del microentorno en que se encuentren (Hendrix *et al.*, 2003). Las células de melanoma muy agresivas pueden reprogramarse y formar estructuras tubulares que constituyen redes similares a las de los vasos sanguíneos; capacidad llamada *vasculogenic mimicry* (VM) (Hendrix *et al.*, 2003; Seftor *et al.*, 2002). La formación de estas redes se puede poner de manifiesto *in vitro*. El crecimiento sobre matrices de colágeno de las células altamente agresivas C8161 permite visualizar la formación de redes tubulares. Sin embargo, las células poco agresivas C81-61 no se extienden apropiadamente sobre la matriz de colágeno y son incapaces de formar estructuras tubulares (Seftor *et al.*, 2005). Observamos que el silenciamiento de PEDF en las células C81-61 les confería la capacidad para formar estructuras tubulares sobre la matriz de colágeno, a diferencia de las células control C81-61-NS o las parentales C81-61, que no se extendían correctamente sobre la matriz de colágeno y con frecuencia aparecían formando agrupaciones de células redondeadas (Figura 23a).

Puesto que la capacidad de VM es una característica de células de melanoma muy agresivas, quisimos evaluar si el silenciamiento de PEDF aumentaba la capacidad metastásica de las células C81-61. Observamos que las células C81-61-shPEDF no fueron capaces de formar colonias metastásicas en los pulmones a las 3 semanas de haber sido inyectadas en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos (Figura 23b). Sorprendentemente, en las secciones de los pulmones de ratones inyectados con células de melanoma en las que se ha interferido PEDF se detectaban estructuras tubulares ramificadas (VM) y *blood lakes* (Figura 23b, paneles superiores). Mediante

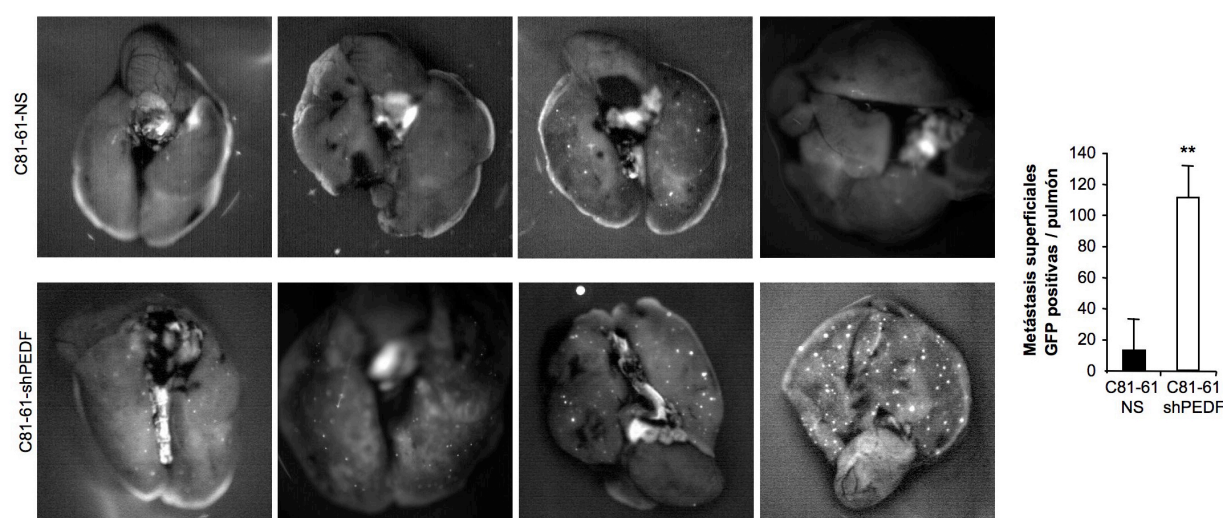
inmunofluorescencia se detectó la proteína GFP, confirmando que estas estructuras tubulares estaban formadas por células de melanoma (Figura 23b, paneles inferiores). La ausencia de PEDF podría, por lo tanto, proporcionar señales que permitan a las células de melanoma sobrevivir en el pulmón y formar estructuras vasculares.



**Figura 23. El silenciamiento de PEDF en la línea celular de melanoma poco agresiva C81-61 aumenta el *vasculogenic mimicry in vitro* e *in vivo*.** (a) Ensayo de *vasculogenic mimicry in vitro* de las líneas celulares de melanoma C81-61, C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Las flechas negras señalan estructuras con forma de túbulo típicas de *vasculogenic mimicry* en las células C81-61-shPEDF. Las micrografías fueron tomadas a los 6 días de cultivo. Barra de escala, 75  $\mu$ m. (b) Formación de estructuras tubulares *in vivo* por las células C81-61-shPEDF. Se muestran tinciones con H&E de secciones de pulmones de ratones inyectados en la vena de la cola con las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Se detectaron estructuras con forma de vasos y *blood lakes* (señalados con flechas negras) en los pulmones de los ratones inoculados con células C81-61-shPEDF, pero no en los inyectados con células C81-61-NS (paneles superiores). Aumentos, 10 $\times$ . En los paneles inferiores se muestra la detección por inmunofluorescencia de GFP (rojo) y la tinción nuclear con DAPI (azul) en las secciones de los pulmones. Aumentos, 20 $\times$ .

Como se describió en la sección de Materiales y Métodos, la mayoría de las líneas celulares de melanoma humano no forman metástasis espontáneas cuando se implantan subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (Fidler, 1986; Fidler *et al.*, 1984; Giovanella and Fogh, 1985; Sordat *et al.*, 1982). Dado que hemos observado que la interferencia de PEDF aumenta la agresividad de las células C81-61, al inducir su capacidad de VM tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 23); analizamos si la interferencia de

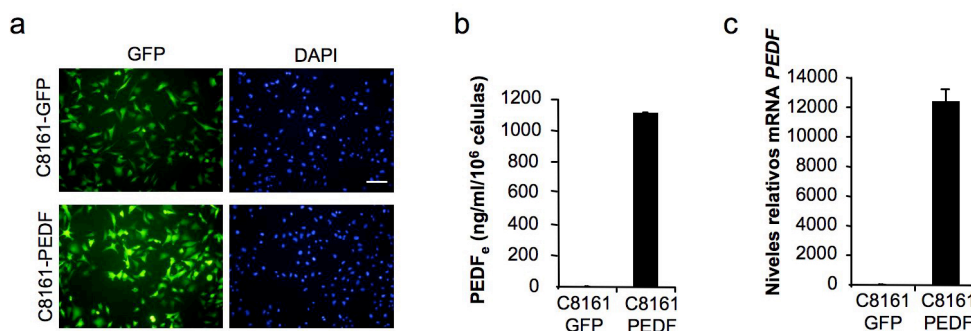
PEDF permitía a las células C81-61 formar metástasis espontáneas a partir de un tumor primario. Sorprendentemente, el silenciamiento de PEDF aumentó significativamente la formación de colonias metastásicas de las células C81-61 en el pulmón tras 9 semanas de haber sido implantadas subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (Figura 24, imágenes en la parte izquierda). La cuantificación del número de metástasis superficiales GFP positivas en los pulmones mostró que la interferencia de PEDF conduce a un aumento de aproximadamente 5 veces en el número de metástasis (Figura 24 derecha).



**Figura 24. El silenciamiento de PEDF en la línea celular de melanoma poco agresiva C81-61 aumenta la capacidad de formar metástasis espontáneas.** Ensayo de metástasis espontáneas a partir de un tumor primario subcutáneo de las líneas celulares de melanoma C81-61-NS o C81-61-shPEDF. Las metástasis en pulmón se detectaron mediante fluorescencia. Se muestran imágenes de fluorescencia de los pulmones (izquierda) y la cuantificación de las metástasis superficiales (derecha). Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ).

Asimismo, evaluamos también los efectos de la sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma muy agresiva C8161. Mediante infección con un lentivirus control (GFP) o un lentivirus de sobreexpresión de PEDF (PEDF) se transdujeron las células C8161 con más del 95% de eficiencia (Figura 25a); y el grado de sobreexpresión se cuantificó mediante ELISA de MC (Figura 25b) y RT-PCR cuantitativa (Figura 25c).

De acuerdo con resultados previos del laboratorio (García *et al.*, 2004), la sobreexpresión de PEDF en las células C8161 disminuyó el número de metástasis superficiales GFP positivas en pulmón en el modelo de metástasis por inyección en vena de la cola de ratones inmunodeprimidos (Figura 26a, paneles superiores). La presencia de metástasis se confirmó mediante análisis histológico (Figura 26a, paneles inferiores). La cuantificación del número de metástasis GFP positivas en la superficie de los pulmones mostró que la sobreexpresión de PEDF reduce aproximadamente 5 veces el número de colonias detectables (Figura 26a derecha).



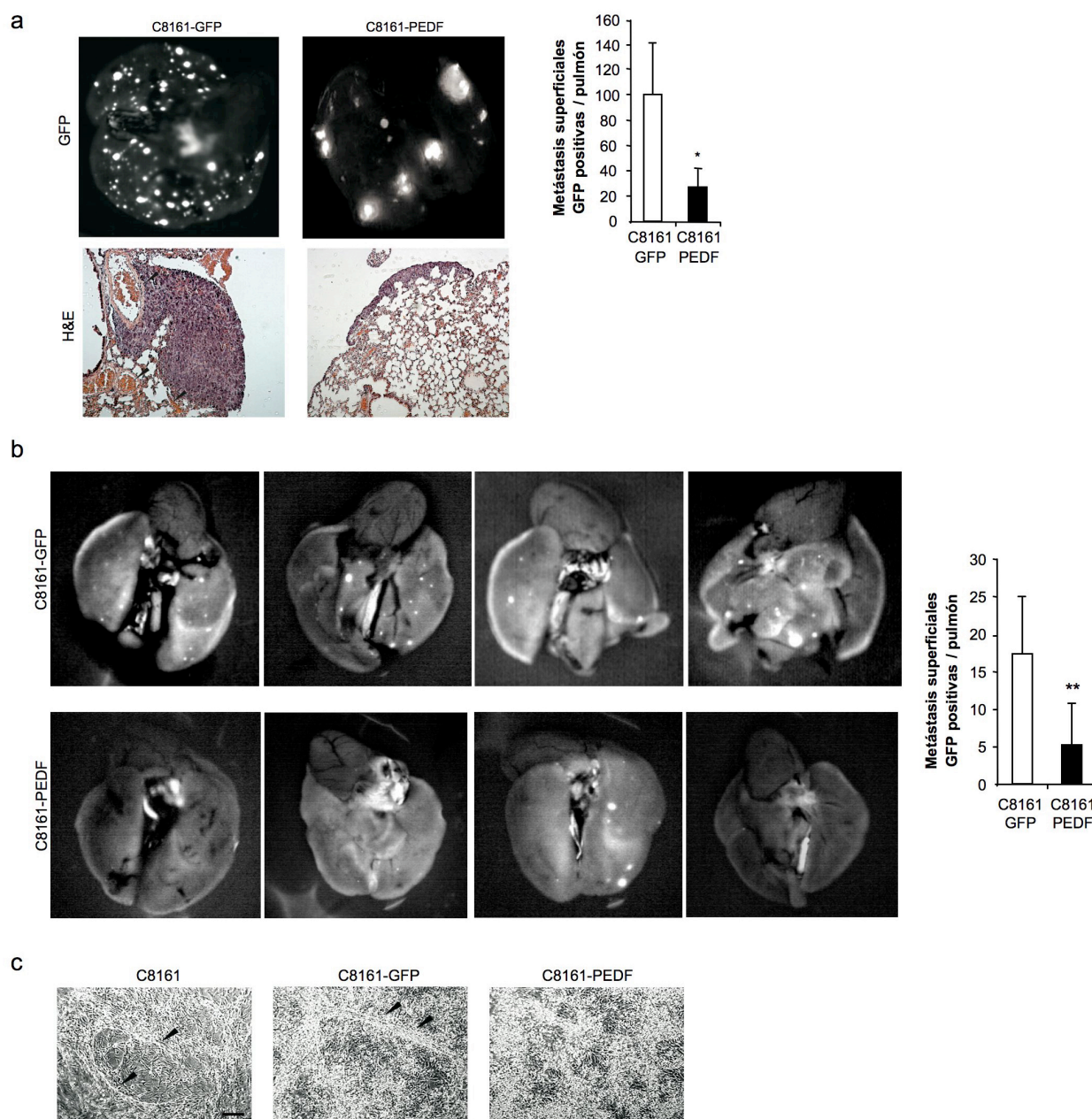
**Figura 25. Sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma altamente agresiva C8161.** (a) Eficiencia de transducción de la línea celular de melanoma C8161 tras la infección a una MOI de 10 con lentivirus control (C8161-GFP) o de sobreexpresión PEDF (C8161-PEDF). Las imágenes de fluorescencia muestran que más del 95% de células son GFP positivas. Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI. Barra de escala, 150  $\mu$ m. (b) Análisis por ELISA de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma C8161-GFP y C8161-PEDF. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (c) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en las líneas celulares de melanoma C8161-GFP y C8161-PEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de la línea celular C8161-GFP tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Ya se ha comentado que la capacidad de formar metástasis espontáneas es muy rara en las líneas celulares de melanoma humano (Fidler, 1986; Fidler *et al.*, 1984; Giovanella and Fogh, 1985; Sordat *et al.*, 1982), existiendo solamente un número limitado de líneas celulares que forman metástasis espontáneas desde un tumor primario, como las líneas celulares LOX (Yang *et al.*, 1999), 113/6-4L (Cruz-Munoz *et al.*, 2008) y C8161 (Welch *et al.*, 1991). Welch y colaboradores caracterizaron exhaustivamente las propiedades metastásicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la línea celular de melanoma muy agresiva C8161. Tras la implantación subcutánea en ratones inmunodeprimidos, las células C8161 forman muy rápidamente tumores primarios que se diseminan espontáneamente y desarrollan metástasis en los pulmones y en los nódulos linfáticos y, en menor medida, en el hígado, corazón, ovario, cavidad peritoneal y piel, en un periodo entre 6 y 10 semanas (Welch *et al.*, 1991).

Por tanto, analizamos si la sobreexpresión de PEDF también era capaz de reducir la formación de metástasis espontáneas de las células C8161. Observamos que la sobreexpresión de PEDF disminuyó la habilidad de las células C8161 de formar metástasis espontáneas en el pulmón y en el hígado desde un tumor primario subcutáneo (Figura 26b izquierda y datos no mostrados). A pesar de que observamos una mayor variabilidad en el número de metástasis por pulmón en este modelo, la cuantificación mostró una reducción significativa de aproximadamente 3 veces en el número de metástasis espontáneas en pulmón en los ratones con tumores subcutáneos de células C8161-PEDF (Figura 26b derecha).

Por otro lado, cuando evaluamos la capacidad de VM, observamos que la sobreexpresión de PEDF impedía, por un lado, la formación de estructuras tubulares sobre matrices de colágeno *in vitro* (Figura 26c); por otro lado, no se observaron *blood lakes*, indicativos de VM, en los pulmones de los ratones inyectados con células C8161-PEDF, mientras que sí se observaron en los pulmones de los ratones inyectados con las células control C8161-GFP (Figura 26a, paneles inferiores).



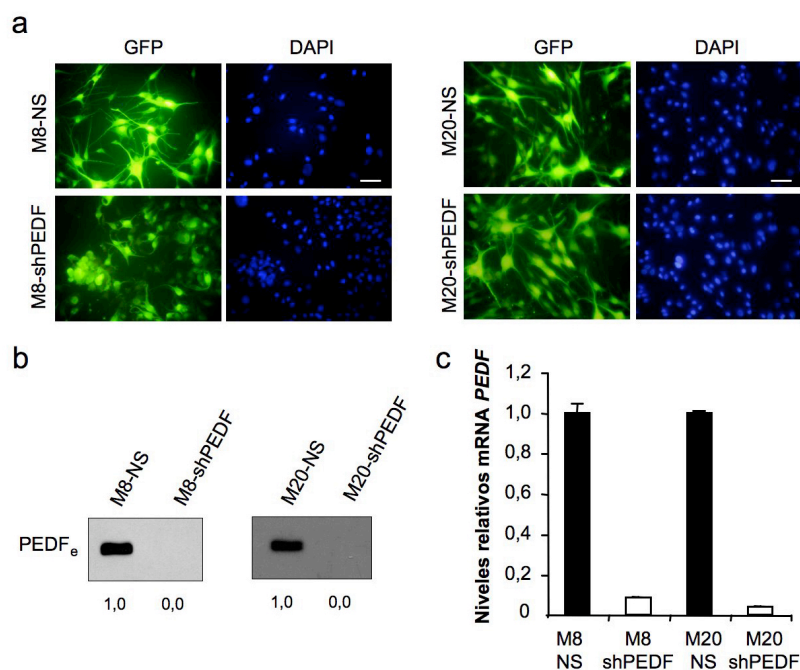


**Figura 26. La sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma muy agresiva C8161 disminuye el potencial metastásico y el *vasculogenic mimicry*.** (a) Ensayo de colonización de pulmón de las líneas celulares de melanoma C8161-GFP y C8161-PEDF. Las metástasis en pulmón se detectaron mediante fluorescencia. Se muestran imágenes de fluorescencia de los pulmones (arriba, izquierda) y la cuantificación de las metástasis superficiales (arriba, derecha). Las barras representan la media  $\pm$  DE, y los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*,  $p < 0,05$ ). Los paneles inferiores muestran tinciones con H&E de secciones de los pulmones. Las flechas señalan estructuras tubulares en los pulmones de los ratones inyectados con las células C8161-GFP. Aumentos, 10 $\times$ . (b) Ensayo de metástasis espontáneas a partir de un tumor primario subcutáneo de las líneas celulares de melanoma C8161-GFP o C8161-PEDF. Las metástasis en pulmón se detectaron mediante fluorescencia. Se muestran imágenes de fluorescencia de los pulmones (izquierda) y la cuantificación de las metástasis superficiales (derecha). Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ). (c) Ensayo de *vasculogenic mimicry in vitro* de las líneas celulares de melanoma C8161, C8161-GFP y C8161-PEDF. Las flechas señalan estructuras con forma de vaso en las células C8161 y C8161-GFP. Las micrografías fueron tomadas a los 6 días de cultivo. Barra de escala, 75  $\mu$ m.

### 1.5. El silenciamiento de PEDF aumenta la capacidad migratoria e invasiva y el potencial proliferativo de los melanocitos

Hemos mostrado que los melanocitos de la piel expresan PEDF a niveles significativamente elevados, similares a los de otros tipos celulares de alta expresión de PEDF (Figura 12). Durante el desarrollo embrionario los melanocitos cutáneos se originan a partir de los melanoblastos, células embrionarias de origen neural con una alta capacidad migratoria y proliferativa. Los melanoblastos migran desde la cresta neural hasta la epidermis basal, diferenciándose a melanocitos que, en cambio, presentan un potencial migratorio y proliferativo mucho más restringido (Lin and Fisher, 2007; Thomas and Erickson, 2008). Por tanto, dada la implicación de PEDF en el control de migración y proliferación, entre otros procesos celulares (Fernández-García *et al.*, 2007), nos preguntamos si en los melanocitos PEDF podría estar afectando directamente a sus propiedades migratorias, invasivas y proliferativas.

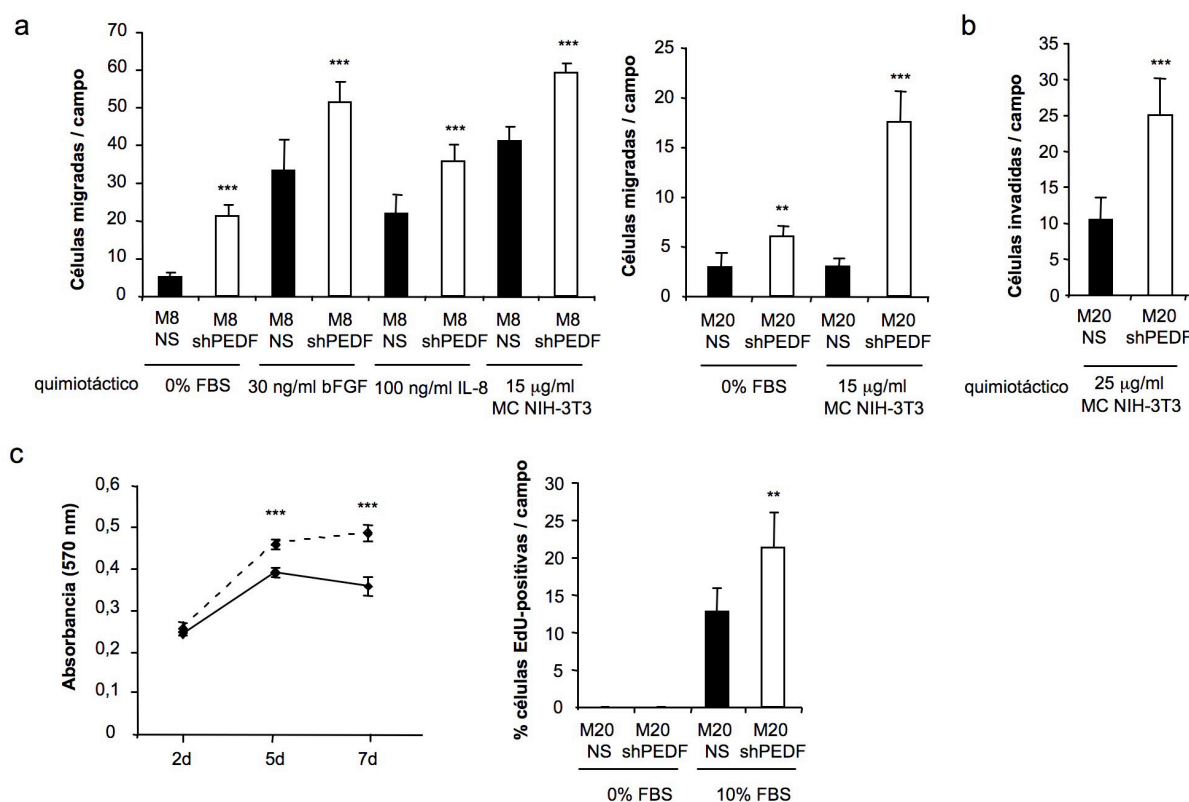
Para verificar esta hipótesis, en primer lugar interferimos la expresión de PEDF en varios cultivos primarios independientes de melanocitos mediante transducción lentiviral del shRNA<sup>mir</sup> específico de PEDF (shPEDF) y del shRNA<sup>mir</sup> control (NS) (Figura 27a). El grado de silenciamiento de PEDF se cuantificó mediante *Western blot* de MC (Figura 27b) y RT-PCR cuantitativa (Figura 27c), siendo el porcentaje de interferencia del mRNA de *PEDF* del 92% en el cultivo M8 y del 96% en el cultivo M20.



cuantificación relativa a la de las células control NS. (c) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en los melanocitos primarios M8-NS, M8-shPEDF, M20-NS y M20-shPEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de las células control NS tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Observamos que el silenciamiento de PEDF aumentó la migración (Figura 28a) e invasión (Figura 28b) de los melanocitos primarios, tanto basal como inducida frente a distintos factores quimiotácticos (bFGF, IL8, o MC de células NIH3T3).

Por otro lado, se analizó la posible implicación de PEDF en el control de la viabilidad y el potencial proliferativo de los melanocitos primarios. Se observó que el silenciamiento de PEDF aumentó moderadamente el crecimiento de los melanocitos en un ensayo MTT (Figura 28c, izquierda); así como el porcentaje de melanocitos en fase S en respuesta a estímulos mitogénicos en un ensayo de incorporación de EdU (Figura 28c, derecha).

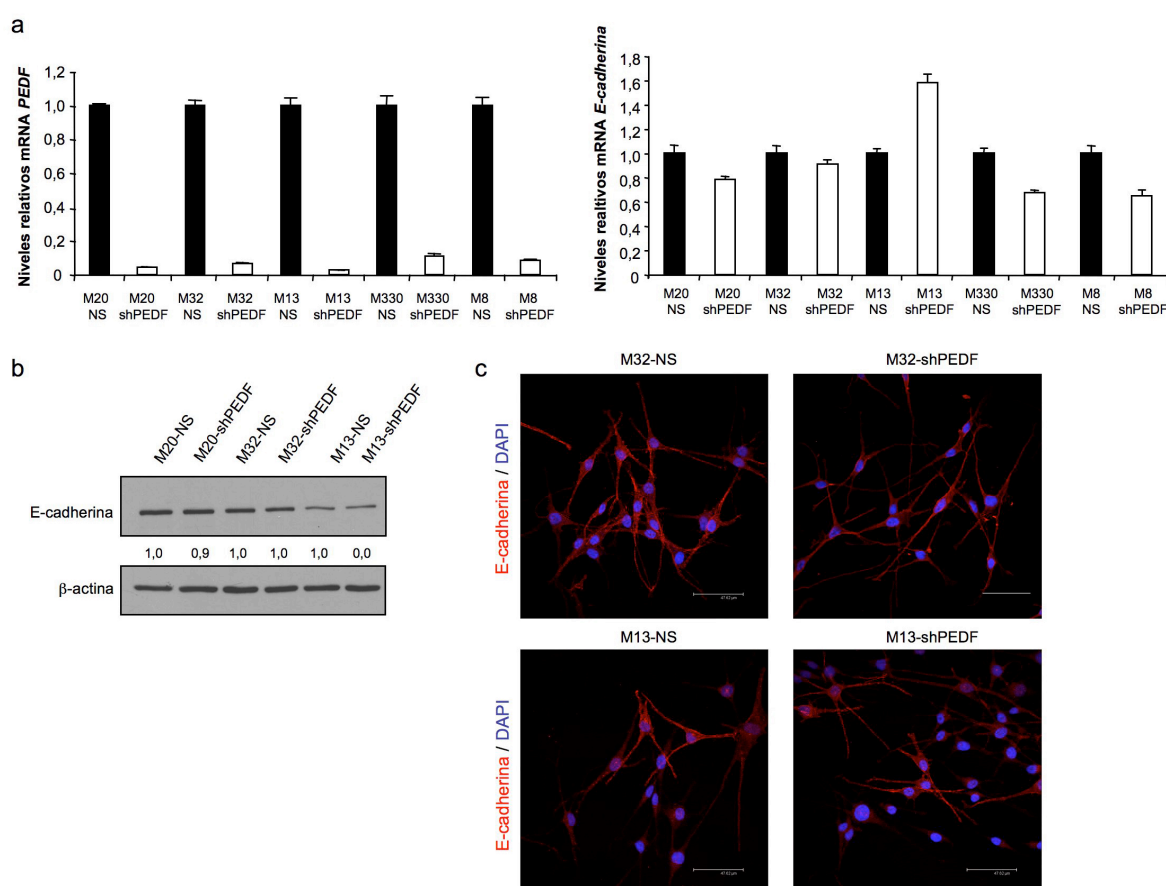


**Figura 28. El silenciamiento de PEDF aumenta la capacidad migratoria e invasiva y el potencial proliferativo de los melanocitos primarios.** (a) Ensayo de migración de los melanocitos primarios M8-NS y M8-shPEDF frente a medio sin suero o con 30 ng/ml bFGF, 100 ng/ml IL8 o 15 µg/ml MC de células NIH-3T3 durante 22 h (panel izquierdo); y de los melanocitos primarios M20-NS y M20-shPEDF frente a medio sin suero o con 15 µg/ml MC de células NIH-3T3 durante 22 h (panel derecho). Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). (b) Ensayo de invasión de los melanocitos primarios M20-NS y M20-shPEDF frente a 25 µg/ml MC células NIH-3T3 durante 24 h. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*,  $p < 0.001$ ). (c) Ensayos de proliferación. Curvas de crecimiento mediante incorporación de MTT en los melanocitos primarios M20-NS (línea continua) y M20-shPEDF (línea punteada) creciendo en presencia de suero; el ensayo de MTT se realizó en los tiempos indicados (panel izquierdo). Incorporación de EdU en los melanocitos primarios M20-NS y M20-shPEDF. Las células fueron deprivadas de suero durante 24 h y después crecieron en presencia de 20 µM EdU en medio sin suero o en medio con 10% FBS durante 24 h adicionales. Las barras representan la media  $\pm$  DE (panel derecho). Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.01$ ).

## 1.6. El silenciamiento de PEDF no afecta a los niveles de expresión ni a la localización subcelular de E-cadherina, MITF y $\beta$ -catenina

### 1.6.1. E-cadherina

En el mantenimiento de la homeostasis de los melanocitos es clave la molécula de adhesión E-cadherina, proteína de membrana a través de la cual los queratinocitos interaccionan con los melanocitos y mantienen controlada su proliferación y migración (Guilford, 1999; Li *et al.*, 2002). De este modo, la pérdida de E-cadherina es uno de los pasos críticos en la progresión del melanoma, ya que su ausencia en los melanocitos les permite escapar del estrecho control que ejercen sobre ellos los queratinocitos, permitiendo un crecimiento y una capacidad invasiva descontrolados; éstas, junto con otras alteraciones que implican una ventaja proliferativa, eventualmente pueden dar lugar al desarrollo de un tumor primario (Hirohashi, 1998; Hsu *et al.*, 2002).



**Figura 29. La expresión de E-cadherina no se modifica tras el silenciamiento de PEDF en melanocitos primarios.** (a) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* (panel izquierdo) y *E-cadherina* (panel derecho) en los melanocitos primarios M20-NS, M20-shPEDF, M32-NS, M32-shPEDF, M13-NS, M13-shPEDF, M330-NS, M330-shPEDF, M8-NS y M8-shPEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* y *E-cadherina* relativos a los de las células control NS tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína E-cadherina en extractos celulares de los melanocitos M20-NS, M20-shPEDF, M32-NS, M32-shPEDF, M13-NS y M13-shPEDF. Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a las células control NS tras corregir por la carga. (c) Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la expresión de E-cadherina en los melanocitos primarios M32-NS y M32-shPEDF (paneles superiores) y M13-NS y M13-shPEDF (paneles inferiores). Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de confocal de la localización de E-cadherina (rojo) y DAPI (azul). Barras de escala, 48  $\mu$ m.



Dado que el silenciamiento de PEDF aumenta la capacidad migratoria e invasiva de los melanocitos primarios, así como su potencial proliferativo, evaluamos si la expresión de E-cadherina se veía afectada. Para ello, se interfirió la expresión de PEDF mediante transducción lentiviral en cinco cultivos primarios independientes de melanocitos (Figura 29a, panel izquierdo), confirmándose en cuatro de ellos (M20, M32, M13 y M8) un aumento en la capacidad migratoria tras el silenciamiento de PEDF (Figura 28a y datos no mostrados). Sin embargo, los niveles de mRNA (Figura 29a, panel derecho) y proteína (Figura 29b) E-cadherina no se vieron afectados significativamente como consecuencia del silenciamiento de PEDF. Estos resultados se confirmaron adicionalmente mediante inmunofluorescencia (Figura 29c).

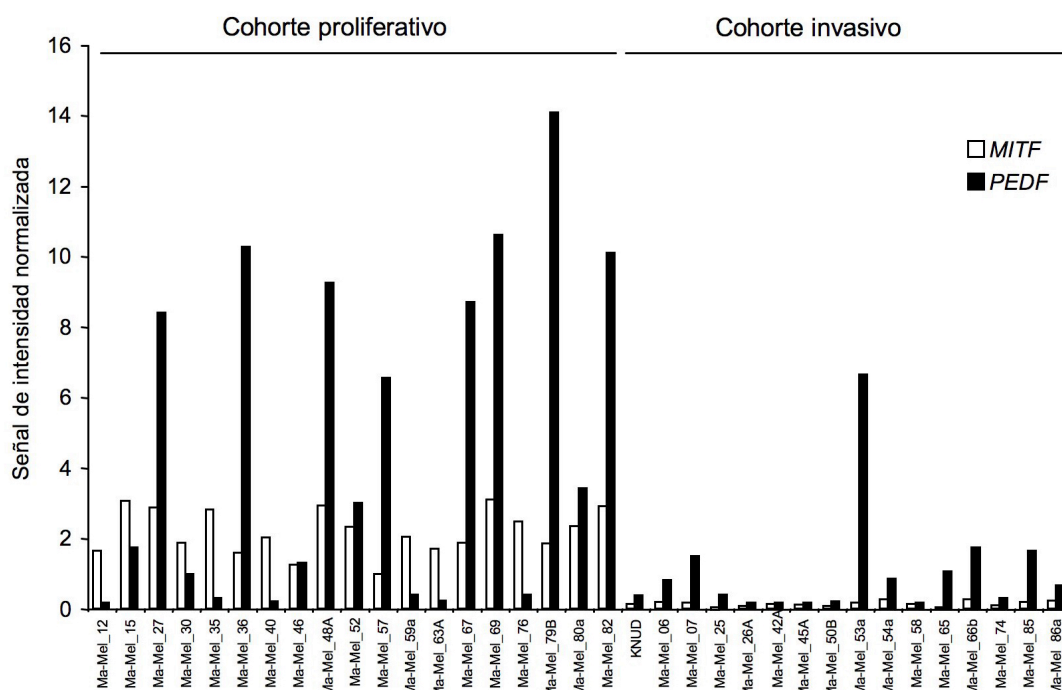
### 1.6.2. MITF

MITF es un factor regulador central en la biología del melanocito y del melanoma. Como se ha comentado previamente, MITF es un factor de transcripción que en los melanocitos está implicado en el control de diversos procesos celulares, como supervivencia, proliferación, migración y producción de melanina (Carreira *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2006). Por otra parte, MITF se expresa en un gran número de melanomas, ya que es esencial para la proliferación y supervivencia de las células de melanoma (Levy *et al.*, 2006; Widlund and Fisher, 2003). Además, en los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel de MITF en el control de migración e invasión en melanoma, de forma que las células requerirían que la actividad y/o los niveles de MITF disminuyan considerablemente para adquirir un fenotipo más migratorio e invasivo (Carreira *et al.*, 2006; McGill *et al.*, 2006).

En el estudio de Hoek y colaboradores en el que se identificaron firmas de expresión molecular que diferenciaban cohortes proliferativos e invasivos (Hoek *et al.*, 2006), la expresión de MITF era una característica central del cohorte proliferativo, mientras que su expresión era muy baja o indetectable en el cohorte invasivo (Figura 30 y Tabla 8). Como ya se ha mostrado anteriormente, la expresión de *PEDF* también era más elevada en las líneas celulares de melanoma del cohorte proliferativo (Tabla 7), correlacionando de forma directa la expresión de *PEDF* y *MITF* en ambos cohortes (Figura 30 y Tabla 8).

**Tabla 8. Diferencias en la expresión de *MITF*, *DKK1* y *PEDF* entre los cohortes proliferativo e invasivo de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma.**

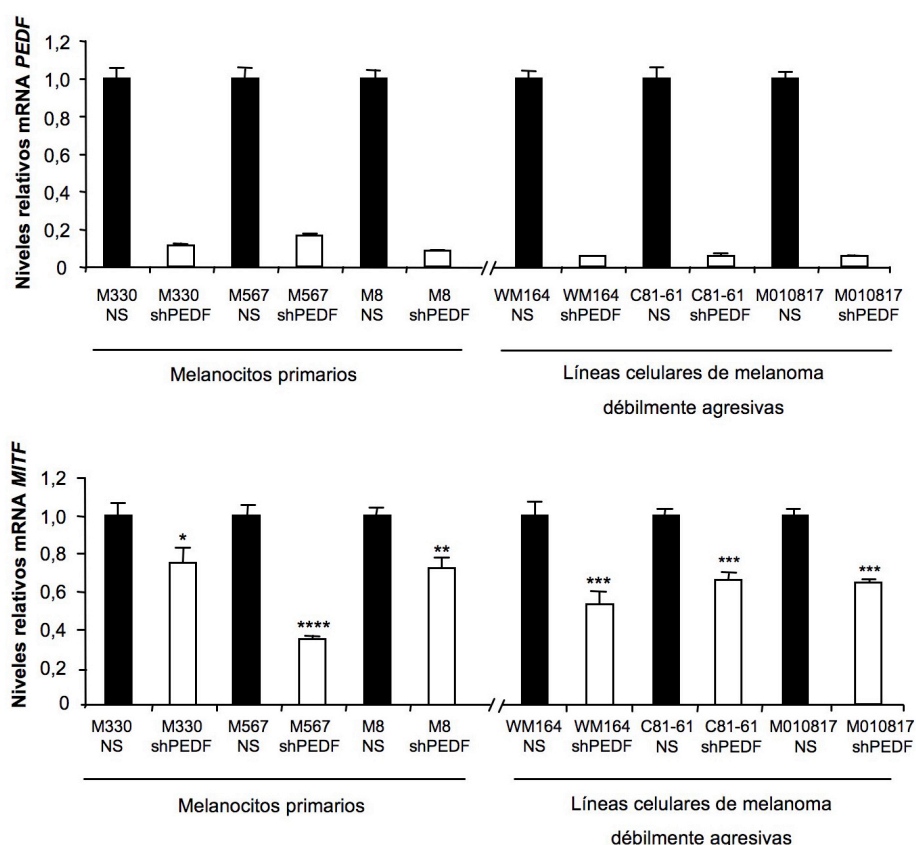
Gen	Proliferativo		Invasivo		Factor	Test estadístico
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar		
<i>MITF</i>	2,18	0,63	0,14	0,07	15,6	t-test, p<0,0001
<i>DKK1</i>	0,70	0,68	8,40	7,40	12	Mann-Whitney, p<0,0001
<i>PEDF</i>	4,74	4,67	1,05	1,59	4,50	Mann-Whitney, p<0,05



**Figura 30. Diferencias en la expresión de *MITF* y *PEDF* entre los cohortes proliferativo e invasivo de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma.** Datos de expresión génica de *MITF* y *PEDF* de *microarrays* de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma. Las líneas celulares fueron clasificadas por su perfil de expresión génica en los cohortes proliferativo e invasivo como se describe en Materiales y Métodos. Se representa la señal de intensidad normalizada de *MITF* (barras blancas) y *PEDF* (barras negras) de cada serie. Los valores medios y de DE y los análisis estadísticos se describen en la Tabla 8.

Teniendo en cuenta esta correlación y puesto que el silenciamiento de *PEDF* aumenta significativamente la migración e invasión de las células de melanoma y de los melanocitos primarios, nos preguntamos si este aumento en la capacidad migratoria podría estar mediado por una disminución de la expresión de *MITF*.

Para ello, interferimos la expresión de *PEDF* mediante transducción lentiviral en cultivos primarios de melanocitos y en líneas celulares de melanoma débilmente agresivas que no han perdido la expresión de *PEDF* (Figura 31, panel superior). Mediante RT-PCR cuantitativa detectamos una reducción de los niveles de *MITF* entre un 25% y un 66% en los melanocitos primarios y en las líneas celulares de melanoma (Figura 31, panel inferior). Sin embargo, estos resultados no fueron reproducidos en un número estadísticamente significativo de experimentos independientes. Observamos una reducción de los niveles de mRNA de *MITF* en tres de nueve experimentos independientes utilizando cultivos primarios de melanocitos procedentes de donadores diferentes, a pesar de que se confirmó el aumento de la capacidad migratoria tras el silenciamiento de *PEDF* en la mayoría de cultivos primarios de melanocitos (Figura 28a y datos no mostrados). De la misma manera, la disminución de los niveles de mRNA de *MITF* en las líneas celulares débilmente agresivas WM164, C81-61 y M010817 sólo se observó en uno de tres experimentos independientes, a pesar del aumento de migración que ocurría tras el silenciamiento de *PEDF* en las células WM164 (Figura 20a) y M010817 (datos no mostrados).

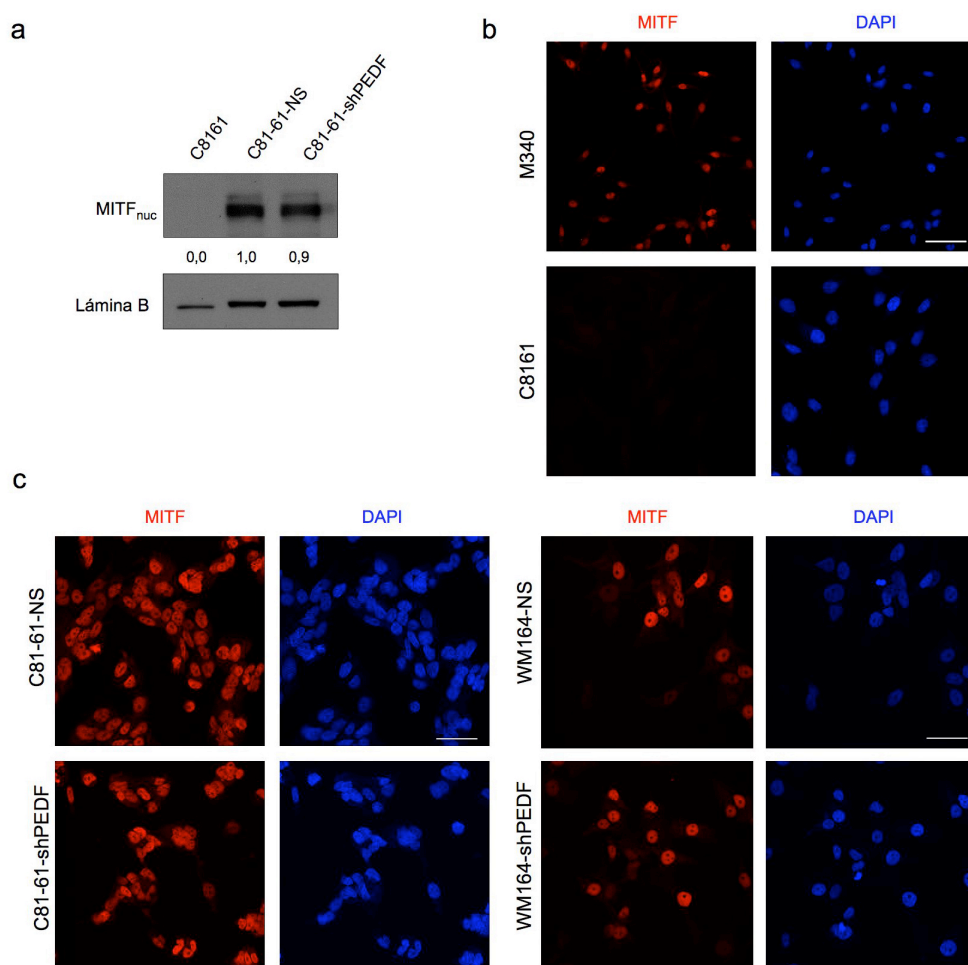


**Figura 31. Expresión de *MITF* tras el silenciamiento de PEDF en melanocitos primarios y líneas celulares de melanoma poco agresivas.** Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* (panel superior) y *MITF* (panel inferior) en los melanocitos primarios M330-NS, M330-shPEDF, M567-NS, M567-shPEDF, M8-NS y M8-shPEDF y en las líneas celulares de melanoma WM164-NS, WM164-shPEDF, C81-61-NS, C81-61-shPEDF, M010817-NS y M010817-shPEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* y *MITF* relativos a los de las células control NS tras la normalización con los niveles de *18S rRNA*. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Se ha descrito que los niveles de expresión de MITF han de estar estrechamente controlados en melanocitos y melanoma, y que esta regulación ocurre tanto a nivel de mRNA como de proteína (Carreira *et al.*, 2006; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Por ello, evaluamos si había cambios en los niveles de proteína MITF tras el silenciamiento de PEDF en líneas de melanoma débilmente agresivas. Sin embargo, mediante *Western blot* de extractos nucleares no detectamos cambios significativos en los niveles de proteína MITF en las células C81-61-shPEDF (Figura 32a). Como control de especificidad del anticuerpo de MITF se utilizaron extractos nucleares de la línea celular de melanoma C8161, que no expresa niveles significativos de MITF (Figura 16e).

Adicionalmente, analizamos cualitativamente la proteína MITF mediante detección por inmunofluorescencia. Previamente, comprobamos que el anticuerpo utilizado detecta MITF de forma específica en el núcleo de melanocitos primarios pero no en la línea celular de melanoma C8161, que no expresa MITF (Figura 32b). No observamos cambios significativos en la expresión de MITF en las

líneas celulares de melanoma débilmente agresivas C81-61 (Figura 32c, izquierda) y WM164 (Figura 32c, derecha) tras el silenciamiento de PEDF.



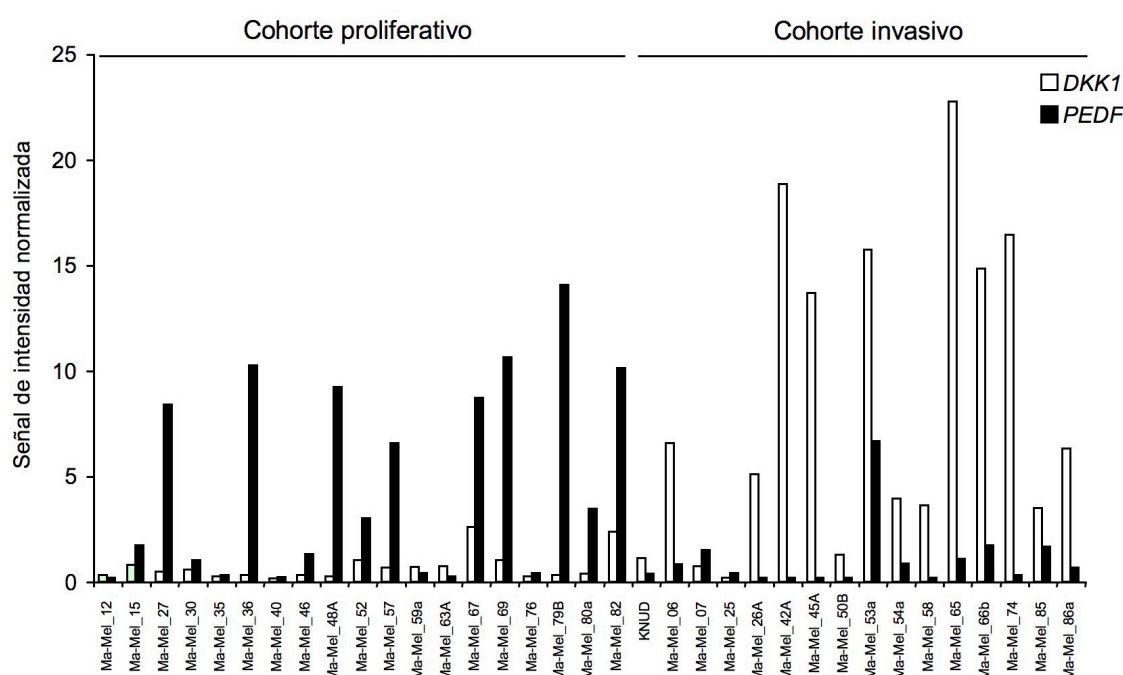
**Figura 32. La expresión de la proteína MITF no se altera tras el silenciamiento de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína MITF nuclear (MITF<sub>nuc</sub>) en extractos nucleares de las líneas celulares de melanoma C8161, C81-61-NS y C81-61-shPEDF. Se usó lámina B como control de carga. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la de las células C81-61-NS tras corregir por la carga. (b) Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la expresión de MITF en melanocitos primarios M340 y en la línea celular de melanoma C8161. Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de confocal de la localización de MITF (rojo) y DAPI (azul). Barra de escala, 50 μM. (c) Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la expresión de MITF en las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF (izquierda) y WM164-NS y WM164-shPEDF (derecha). Se muestran imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de confocal de la localización de MITF (rojo) y DAPI (azul). Barras de escala, 50 μM.

### 1.6.3. Ruta Wnt/ $\beta$ -catenina

En los últimos años, diversos estudios han revelado la importancia de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina en la biología de los melanocitos y en el desarrollo y progresión del melanoma. En la mayoría de las células normales, entre ellas los melanocitos, la  $\beta$ -catenina se encuentra en la membrana plasmática asociada con las cadherinas, participando en la adhesión célula-célula. Ante determinados estímulos,

como algunos factores Wnt, parte de la  $\beta$ -catenina se transloca desde la membrana plasmática al núcleo, donde participa en la regulación de genes diana implicados en la proliferación, pigmentación y otros procesos, como *MITF* o *SOX10*, entre otros (Weeraratna, 2005). En cuanto al melanoma, existe cierta controversia sobre la implicación de esta ruta en el desarrollo de estos tumores, ya que en varios estudios se apunta a que su activación aberrante promovería la progresión tumoral (Murakami *et al.*, 2001; Rimm *et al.*, 1999), aunque en otros se sugiere que lo que ocurriría es una inhibición de esta vía en la progresión del melanoma hacia metástasis (Demunter *et al.*, 2002).

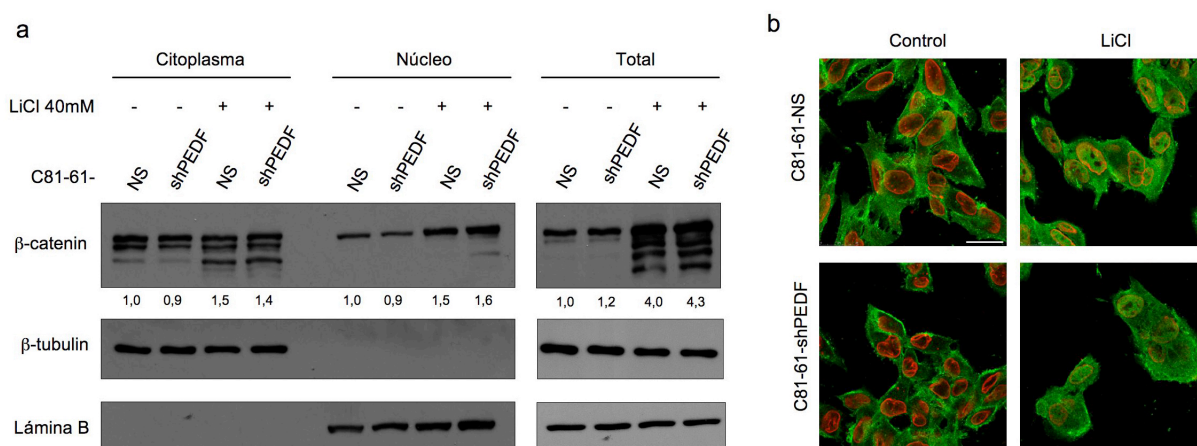
Como ya se ha comentado anteriormente, Hoek y colaboradores (Hoek *et al.*, 2006) propusieron que en las células de melanoma del cohorte proliferativo la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina estaría activada manteniendo, en parte, los altos niveles de *MITF*, entre otros genes diana. Sin embargo, en el caso de las células con el fenotipo invasivo esta ruta estaría inhibida como consecuencia del aumento de la expresión de antagonistas de la vía Wnt, como *DKK1* (Figura 33), o factores relacionados con TGF $\beta$ , entre otros. En consonancia con estos antecedentes, comprobamos que en la serie de Mannheim los niveles de expresión de *DKK1* y *PEDF* correlacionaban de manera inversa en ambos cohortes (Figura 33 y Tabla 8).



**Figura 33. Diferencias en la expresión de *DKK1* y *PEDF* entre los cohortes proliferativo e invasivo de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma.** Datos de expresión génica de *DKK1* y *PEDF* de *microarrays* de la serie Mannheim de líneas celulares de melanoma. Las líneas celulares fueron clasificadas por su perfil de expresión génica en los cohortes proliferativo e invasivo como se describe en Materiales y Métodos. Se representa la señal de intensidad normalizada de *DKK1* (barras blancas) y *PEDF* (barras negras) de cada serie. Los valores medios y de DE y los análisis estadísticos se describen en la Tabla 8.

Considerando estos antecedentes, nos preguntamos si PEDF podría afectar al funcionamiento de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Analizamos si el silenciamiento de PEDF afecta a la expresión y/o distribución subcelular de la  $\beta$ -catenina en los melanocitos y en células de melanoma, en condiciones basales o tras el tratamiento con cloruro de litio (LiCl), inhibidor de la GSK-3 $\beta$  que permite la estabilización y translocación al núcleo de la  $\beta$ -catenina (González-Sancho *et al.*, 2005).

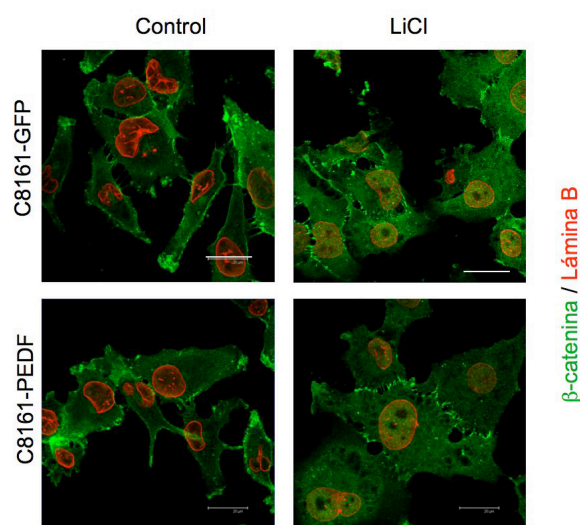
En primer lugar, se analizó la expresión de  $\beta$ -catenina mediante *Western blot* de las fracciones proteicas citoplásmicas y nucleares en las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF. La Figura 34a muestra que no había diferencias significativas en la expresión de  $\beta$ -catenina tras el silenciamiento de PEDF, tanto en células sin tratar como tratadas con LiCl. De acuerdo con estos resultados, mediante inmunofluorescencia tampoco observamos diferencias en la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina tras el silenciamiento de PEDF (Figura 34b).



**Figura 34. La expresión y localización de la  $\beta$ -catenina en la línea celular de melanoma C81-61 no se modifican tras el silenciamiento de PEDF.** (a) Análisis por *Western blot* de extractos citoplásmicos, nucleares y totales de las líneas celulares de melanoma C81-61-NS y C81-61-shPEDF sin tratar o tratadas durante 2 h con 40 mM LiCl. Se utilizó  $\beta$ -tubulina como control de carga citoplásmico y lámina B como control de carga nuclear. Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de las células C81-61-NS sin tratar tras corregir por la proteína constitutiva correspondiente. (b) Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la expresión de  $\beta$ -catenina en las líneas celulares C81-61-NS y C81-61-shPEDF sin tratar o tratadas durante 2 h con 40 mM LiCl. Se muestra la localización de  $\beta$ -catenina (verde) y lámina B (rojo). Barra de escala, 25  $\mu$ m.

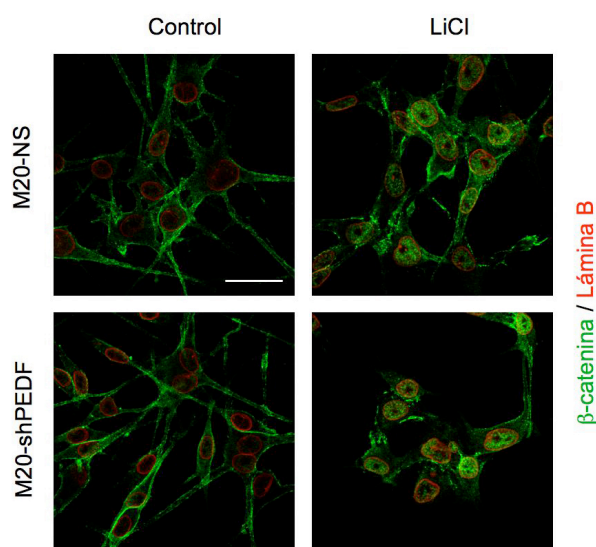
Adicionalmente, evaluamos si la expresión de  $\beta$ -catenina en las células de melanoma muy agresivas C8161 se veía afectada por la sobreexpresión de PEDF. Mediante el análisis por inmunofluorescencia no detectamos diferencias en la expresión ni en la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina en las células C8161-PEDF comparadas con las células control C8161-GFP (Figura 35).





**Figura 35. La localización de la  $\beta$ -catenina en la línea celular de melanoma C8161 no cambia tras la sobreexpresión de PEDF.** Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de  $\beta$ -catenina en las líneas celulares C8161-GFP y C8161-PEDF sin tratar o tratadas durante 2 h con 40 mM LiCl. Se muestra la localización de  $\beta$ -catenina (verde) y lámina B (rojo). Barras de escala, 25  $\mu$ m.

Por último, nos preguntamos si en células normales no transformadas, los melanocitos primarios, el silenciamiento de la expresión de PEDF podría estar afectando a la expresión y/o localización subcelular de la  $\beta$ -catenina. Sin embargo, el análisis mediante inmunofluorescencia no reveló cambios en la expresión ni en la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina en melanocitos primarios tras el silenciamiento de PEDF, tanto en condiciones basales como en respuesta al tratamiento con LiCl (Figura 36).



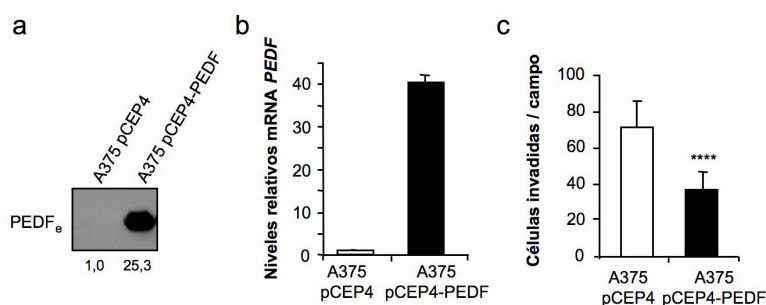
**Figura 36. La localización de la  $\beta$ -catenina en melanocitos primarios no varía tras el silenciamiento de PEDF.** Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de  $\beta$ -catenina en los melanocitos primarios M20-NS y M20-shPEDF sin tratar o tratados durante 2 h con 40 mM LiCl. Se muestra la localización de  $\beta$ -catenina (verde) y lámina B (rojo). Barra de escala, 25  $\mu$ m.

## 2. GENES REGULADOS POR PEDF EN LA LÍNEA CELULAR DE MELANOMA HUMANO A375

### 2.1. Cambios en el perfil de expresión génica global inducidos por la sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma humano A375

Ya se ha comentado que PEDF presenta una potente actividad antitumoral y antimetastásica en el melanoma. Estos efectos de PEDF se basan en un mecanismo de acción dual, que permite modular a las células de melanoma y a las células endoteliales, uno de los componentes más relevantes del microentorno tumoral (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009). Por un lado, PEDF inhibe la angiogénesis tumoral, lo que eventualmente retrasa el crecimiento del tumor primario (por limitación en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, entre otros factores) e impide la diseminación metastásica de las células tumorales vía sanguínea. Además, PEDF ejerce acciones directas sobre las células tumorales, induciendo apoptosis y diferenciación, e inhibiendo su capacidad migratoria e invasiva; efectos que se traducen globalmente en una disminución del potencial metastásico (García *et al.*, 2004).

Al inicio de la presente Tesis Doctoral se desconocían las moléculas y vías de señalización implicadas en los efectos directos de PEDF en el melanoma. Por tanto, con el fin de profundizar en el mecanismo molecular de acción antitumoral y antimetastásica de PEDF y, concretamente, en los efectos directos de este factor sobre las células de melanoma, se empleó un abordaje de análisis global de las variaciones en la expresión génica inducidas por la sobreexpresión de PEDF en líneas celulares de melanoma humano.



**Figura 37. Sobreexpresión de PEDF en la línea celular de melanoma A375.** (a) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4 y A375-pCEP4-PEDF. Los números debajo de las imágenes

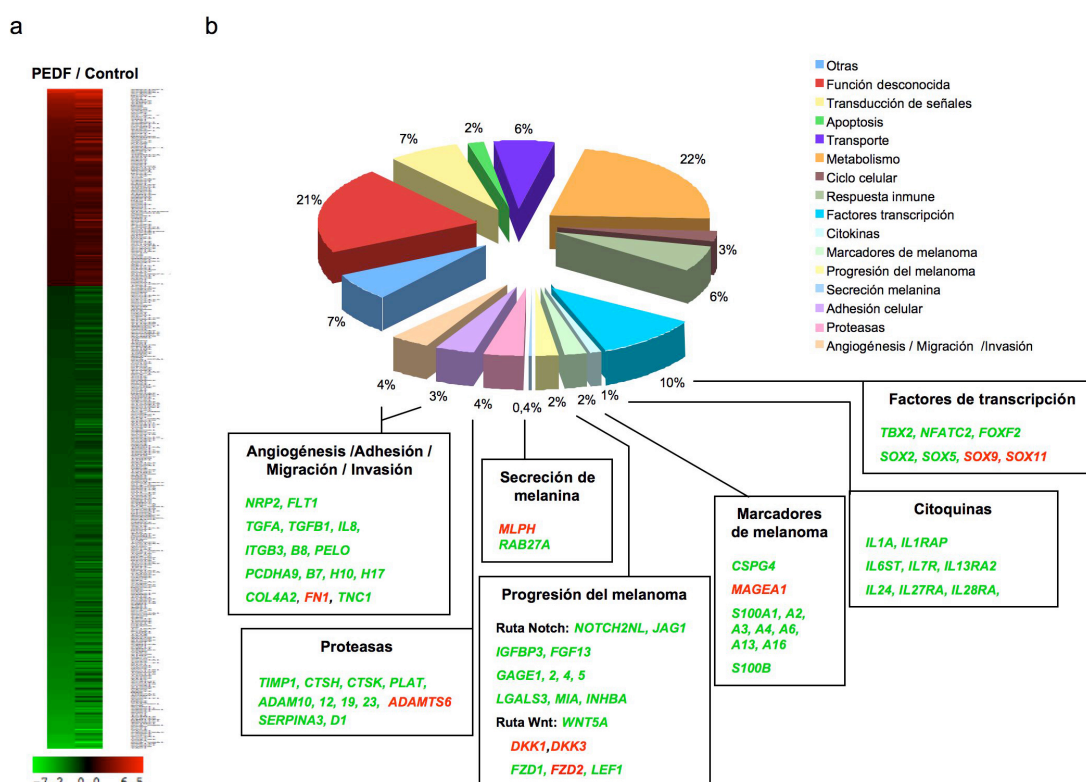
muestran la cuantificación relativa a la expresión de las células A375-pCEP4. (b) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4 y A375-pCEP4-PEDF. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de la línea celular A375-pCEP4 tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (c) Ensayo de invasión de las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4 y A375-pCEP4-PEDF frente a 10% FBS durante 24 h. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

En primer lugar, se modificó mediante transfección la línea celular de melanoma humano A375 para que expresara niveles elevados de PEDF de forma estable (A375-pCEP4-PEDF); como control se generó la línea celular A375-pCEP4. La sobreexpresión de PEDF se comprobó a nivel de proteína mediante *Western blot* de MC (Figura 37a) y a nivel de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 37b). Adicionalmente, se confirmó que las células que sobreexpresan PEDF presentan una menor



capacidad invasiva con respecto a las células control (Figura 37c), de acuerdo a datos publicados (García *et al.*, 2004).

A continuación, se realizó un análisis global de expresión génica de los cambios inducidos en el perfil de expresión génica por la sobreexpresión de PEDF utilizando *microarrays* de genoma humano completo Affymetrix *HG-U133 Plus 2.0*. Se realizaron dos hibridaciones utilizando RNAs extraídos de experimentos independientes para cada línea celular. Del total de sondas del *microarray*, 757 presentaban una expresión diferencial (aumento o disminución igual o mayor de 2 veces) en las células que sobreexpresan PEDF con respecto a las células control en las dos hibridaciones. De las 757 sondas reguladas, 465 correspondían a genes caracterizados (con símbolo génico y anotación en el NCBI). De estos, en la mayoría (326) la expresión disminuía (dos veces o más) en la línea celular que sobreexpresa PEDF, mientras que 139 genes estaban inducidos dos o más veces como consecuencia de la sobreexpresión de PEDF. En la Figura 38a se muestra un mapa (*heat map*) del perfil de expresión génica de las dos hibridaciones, en el que se observa la mayoritaria disminución de la expresión de genes por PEDF anteriormente comentada.

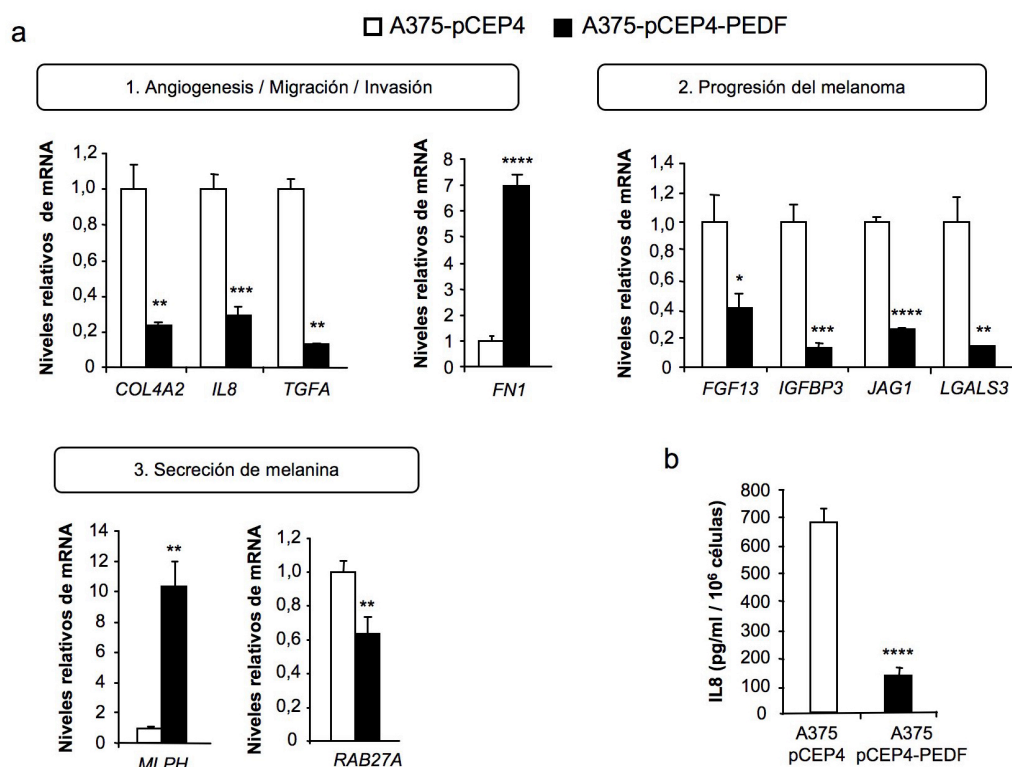


**Figura 38. Genes regulados por PEDF en la línea celular de melanoma A375.** (a) Mapa (*heat map*) del perfil de expresión de los genes regulados en las células A375-pCEP4-PEDF con respecto a las células control A375-pCEP4. Los colores representan la intensidad de señal normalizada de  $\log_2$  (PEDF/control): verde, disminución de la expresión; negro, sin cambio; rojo: aumento de la expresión. (b) Agrupación de los genes regulados por procesos biológicos y/o categorías funcionales. Se muestra el porcentaje de genes regulados de cada proceso/categoría respecto al total de genes regulados. De algunos procesos se hace un listado con los genes regulados más relevantes, apareciendo en verde los genes cuya expresión disminuye y en rojo los genes cuya expresión aumenta en las células A375-pCEP4-PEDF con respecto a las células control A375-pCEP4.

Entre los genes regulados se encuentran genes relevantes para el control de los procesos de angiogénesis, migración e invasividad (Figura 38b y Tabla 9). PEDF disminuía la expresión de varias moléculas de la ruta del factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*), como la tirosina-quinasa de tipo 1 relacionada con Fms (*FLT1*) y la neuropilina 2 (*NRP2*). Además, varios factores promigratorios veían reducida su expresión, como interleuquina 8 (*IL8*), factor de crecimiento transformante tipo alfa (TGFA) y factor de crecimiento transformante tipo beta-inducido (*TGFB1*); de los cuales se validaron por RT-PCR cuantitativa *IL8* y *TGFA* (Figura 39a), e *IL8* también a nivel de proteína mediante ELISA de MC (Figura 39b). Asimismo, PEDF modificó la expresión de moléculas de la matriz extracelular, como colágeno IV (*COL4A2*) o fibronectina (*FNI*), cuya regulación se validó por RT-PCR cuantitativa (Figura 39a); o moléculas relacionadas con procesos de adhesión, como varias integrinas, cadherinas y protocadherinas, así como diferentes proteasas de varias familias: inhibidores de metaloproteasas específicos de tejido (TIMP); proteasas con dominio disintegrina (ADAM); proteasas tipo disintegrina con dominio tipo trombospondina (ADAMTS); e inhibidores de serin-proteasas (SERPIN) (Figura 38b y Tabla 9).

Por otro lado, se identificaron numerosos genes regulados por PEDF que habían sido descritos previamente como implicados en la progresión y malignización del melanoma humano (Gupta *et al.*, 2005; Hoek *et al.*, 2004; Hoek *et al.*, 2006) (Figura 38b y Tabla 9). Dentro de esta categoría de genes, se encuentran varios de la ruta Notch (Pinnix and Herlyn, 2007), como el homólogo 2 de Notch (*NOTCH2NL*) y *jagged 1* (*JAG1*), de los que se validó *JAG1* por RT-PCR cuantitativa (Figura 39a); y genes de la ruta Wnt (Weeraratna, 2005), como *WNT5A*, los miembros 1 y 3 de la familia *Dickkopf* (*DKK1*, *DKK3*), el receptor *Frizzled 1* (*FZD1*) y el factor activador de linfocitos 1 (*LEF1*), entre otros. En todos los genes mencionados, su regulación por PEDF (aumento o disminución) se corresponde con la modulación esperada en células que presentan menor agresividad.

Asimismo, PEDF disminuyó la expresión de otros genes implicados en la progresión del melanoma, como el factor de crecimiento de fibroblastos 13 (*FGF13*), inhibina beta A (*INHBA*), proteína de unión a factores tipo insulina 3 (*IGFBP3*) y galectina 3 (*LGALS3*), de los cuales se validaron por RT-PCR cuantitativa *FGF13*, *IGFBP3* y *LGALS3* (Figura 39a). Por otra parte, numerosos marcadores tumorales de melanoma, cuya expresión aumenta con el grado de malignización, se expresaban a niveles inferiores en las células que sobreexpresan PEDF, como *MIA* (actividad inhibitoria de melanoma), los miembros 1, 2, 4 y 5 de la familia de antígenos G (GAGE), antígeno de melanoma A1 (*MAGEA1*) y varios genes de la familia de proteínas de unión a calcio S100, entre ellos *S100-β* (Figura 38b y Tabla 9). Sorprendentemente, la melanofilina (*MLPH*) y *RAB27A*, moléculas implicadas en la secreción de melanina en los melanocitos (Hume *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002), tenían su expresión aumentada y disminuida respectivamente en las células que sobreexpresan PEDF (Figura 38b y Tabla 9); para ambos genes, este dato fue confirmado a nivel de mRNA (Figura 39a).



**Figura 39. Validación de la regulación por PEDF de genes seleccionados en la línea celular de melanoma A375.** (a) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de genes relacionados con: 1) angiogénesis/migración/invasión: *COL4A2*, *IL8* y *TGFA*; 2) progresión del melanoma: *FGF13*, *IGFBP3*, *JAG1* y *LGALS3*; y 3) secreción de melanina: *MLPH* y *RAB27A*. Las barras blancas corresponden a la línea celular A375-pCEP4, y las barras negras a la línea celular A375-pCEP4-PEDF. Se muestran los niveles de mRNA de cada gen relativos a los de la línea celular A375-pCEP4 tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE, y los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test Student o del test de Student con corrección de Welch (para los genes *COL4A2*, *TGFA*, *LGALS3* y *MLPH*) (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ). (b) Análisis por ELISA de los niveles de proteína IL8 secretada en MC de 48 h de las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4 y A375-pCEP4-PEDF. Las barras representan la media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

Por último, la sobreexpresión de PEDF redujo la expresión de diversos factores de transcripción, como T-box 2 (*TBX2*), el factor nuclear de células T activadas dependiente de calcineurinas 2 (*NFATC2*) o varios miembros de la familia SOX (SRY (región determinante del sexo Y)-box), así como de varias citoquinas y moléculas implicadas en la modulación de la respuesta inmune (Figura 38b y Tabla 9).

De esta manera, el perfil de expresión génica asociado a la sobreexpresión de PEDF nos permite explicar la menor agresividad y malignidad que se observa en las células de melanoma que sobreexpresan este factor.

**Tabla 9. Genes regulados por PEDF en la línea celular de melanoma humano A375.** Se muestra el símbolo génico y su descripción para los genes regulados más relevantes; así como la relación de las intensidades PEDF/Control en las dos hibridaciones que se realizaron con RNAs extraídos independientemente de las líneas celulares A375-pCEP4-PEDF y A375-pCEP4 (Hib. 1 e Hib. 2). Los genes aparecen clasificados en las categorías descritas en el texto.

ANGIOGÉNESIS/ADHESIÓN/MIGRACIÓN/INVASIÓN			
Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>COL4A2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	0,50	0,46
<i>FLT1</i>	<i>Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>	0,05	0,07
<i>FN1</i>	<i>Fibronectin 1</i>	14,22	16,52
<i>IL8</i>	<i>Interleukin 8</i>	0,36	0,36
<i>ITGB3</i>	<i>Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	0,30	0,26
<i>ITGB8</i>	<i>Integrin, beta 8</i>	0,11	0,19
<i>NRP2</i>	<i>Neuropilin 2</i>	0,40	0,41
<i>PCDH10</i>	<i>Protocadherin 10</i>	0,10	0,12
<i>PCDH17</i>	<i>Protocadherin 17</i>	0,34	0,27
<i>PCDHA9</i>	<i>Protocadherin alpha 9</i>	0,46	0,48
<i>PCDHB7</i>	<i>Protocadherin beta 7</i>	0,34	0,34
<i>PELO</i>	<i>Integrin, alpha 1</i>	0,12	0,15
<i>PLAT</i>	<i>Plasminogen activator, tissue</i>	0,39	0,40
<i>TGFA</i>	<i>Transforming growth factor, alpha</i>	0,03	0,04
<i>TGFBI</i>	<i>Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>	0,41	0,43
PROTEASAS			
Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>ADAM10</i>	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 10</i>	0,46	0,46
<i>ADAM12</i>	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin alpha)</i>	0,27	0,47
<i>ADAM19</i>	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)</i>	0,06	0,09
<i>ADAM23</i>	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 23</i>	0,08	0,10
<i>ADAMTS6</i>	<i>A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 6</i>	3,39	8,66
<i>CTSH</i>	<i>Cathepsin H</i>	0,17	0,30
<i>CTSK</i>	<i>Cathepsin K (pseudodeficiency)</i>	0,08	0,10
<i>PLAT</i>	<i>Plasminogen activator, tissue</i>	0,39	0,40
<i>SERPINA3</i>	<i>Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3</i>	0,05	0,04
<i>SERPIND1</i>	<i>Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1</i>	0,07	0,07
<i>TIMP1</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)</i>	0,33	0,32
SECRECIÓN DE MELANINA			
Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>MLPH</i>	<i>Melanophilin</i>	15,70	28,90
<i>RAB27A</i>	<i>RAB27A, member RAS oncogene family</i>	0,31	0,22

Continúa en la página siguiente

Tabla 9 (viene de la página anterior)

## PROGRESIÓN DEL MELANOMA

Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>DKK1</i>	<i>Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)</i>	2,86	2,87
<i>DKK3</i>	<i>Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)</i>	2,28	2,85
<i>FGF13</i>	<i>Fibroblast growth factor 13</i>	0,14	0,08
<i>FZD1</i>	<i>Frizzled homolog 1 (Drosophila)</i>	0,37	0,42
<i>FZD2</i>	<i>Frizzled homolog 2 (Drosophila)</i>	2,60	2,38
<i>GAGE1</i>	<i>G antigen 1</i>	0,35	0,46
<i>GAGE2</i>	<i>G antigen 2</i>	0,11	0,10
<i>GAGE4</i>	<i>G antigen 4</i>	0,45	0,38
<i>GAGE5</i>	<i>G antigen 5</i>	0,24	0,31
<i>IGFBP3</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>	0,11	0,22
<i>INHBA</i>	<i>Inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)</i>	0,18	0,24
<i>JAG1</i>	<i>Jagged 1 (Alagille syndrome)</i>	0,14	0,13
<i>LEF1</i>	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>	0,48	0,37
<i>LGALS3</i>	<i>Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) ///</i> <i>galectin-3 internal gene</i>	0,23	0,21
<i>MIA</i>	<i>Melanoma inhibitory activity</i>	0,48	0,44
<i>NOTCH2NL</i>	<i>Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like</i>	0,29	0,26
<i>WNT5A</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>	0,48	0,50

## MARCADORES DE MELANOMA

Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>CSPG4</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (melanoma-associated)</i>	0,19	0,24
<i>MAGEA1</i>	<i>Melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E)</i>	2,78	2,78
<i>S100A1</i>	<i>S100 calcium binding protein A1</i>	0,33	0,13
<i>S100A13</i>	<i>S100 calcium binding protein A13</i>	0,38	0,33
<i>S100A16</i>	<i>S100 calcium binding protein A16</i>	0,29	0,36
<i>S100A2</i>	<i>S100 calcium binding protein A2</i>	0,30	0,27
<i>S100A3</i>	<i>S100 calcium binding protein A3</i>	0,15	0,12
<i>S100A4</i>	<i>S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)</i>	0,10	0,09
<i>S100B</i>	<i>S100 calcium binding protein, beta (neural)</i>	0,13	0,10

## FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Símbolo	Descripción	Relación de intensidad de PEDF/Control	
		Hib. 1	Hib. 2
<i>FOXF2</i>	<i>Forkhead box F2</i>	2,16	2,32
<i>NFATC2</i>	<i>Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-depe.</i> <i>2</i>	0,29	0,22
<i>SOX11</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 11</i>	3,85	4,10
<i>SOX2</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>	0,41	0,46
<i>SOX5</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 5</i>	0,20	0,08
<i>SOX9</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)</i>	2,27	12,34
<i>TBX2</i>	<i>T-box 2</i>	0,24	0,19

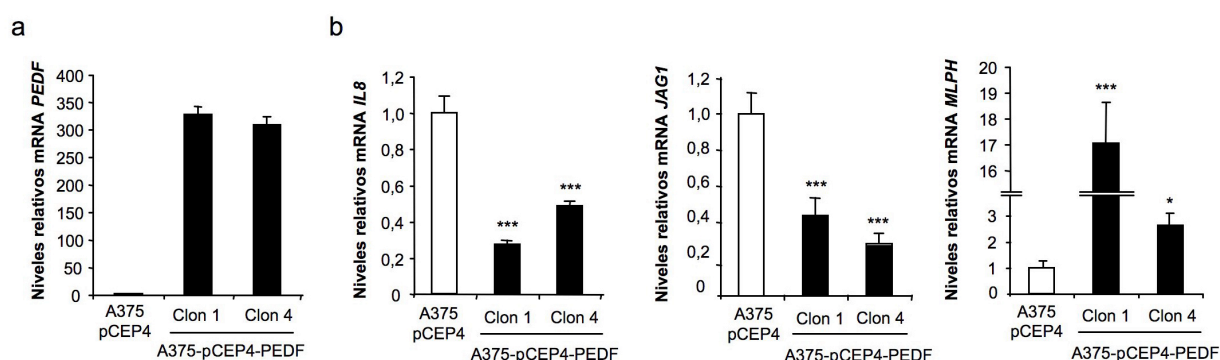
Continúa en la página siguiente

Tabla 9 (viene de la página anterior)

CITOQUINAS		Relación de intensidad de PEDF/Control	
Símbolo	Descripción	Hib. 1	Hib. 2
<i>IL13RA2</i>	<i>Interleukin 13 receptor, alpha 2</i>	0,41	0,44
<i>IL1A</i>	<i>Interleukin 1, alpha</i>	0,16	0,11
<i>IL1RAP</i>	<i>Interleukin 1 receptor accessory protein</i>	0,17	0,14
<i>IL24</i>	<i>Interleukin 24</i>	0,06	0,07
<i>IL6ST</i>	<i>Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)</i>	0,38	0,38

## 2.2. Regulación de la expresión de IL8, JAG1 y MLPH por PEDF en el melanoma A375

Adicionalmente, quisimos consolidar la regulación de algunos de los genes modulados por PEDF en otras líneas celulares generadas de manera independiente. Por un lado, mediante transfección se aislaron varios clones estables de sobreexpresión de PEDF en la línea celular A375 (Figura 40a), y se comprobó mediante RT-PCR cuantitativa que presentaban niveles inferiores de *IL8* y *JAG1* y superiores de *MLPH* con respecto a las células control (Figura 40b).

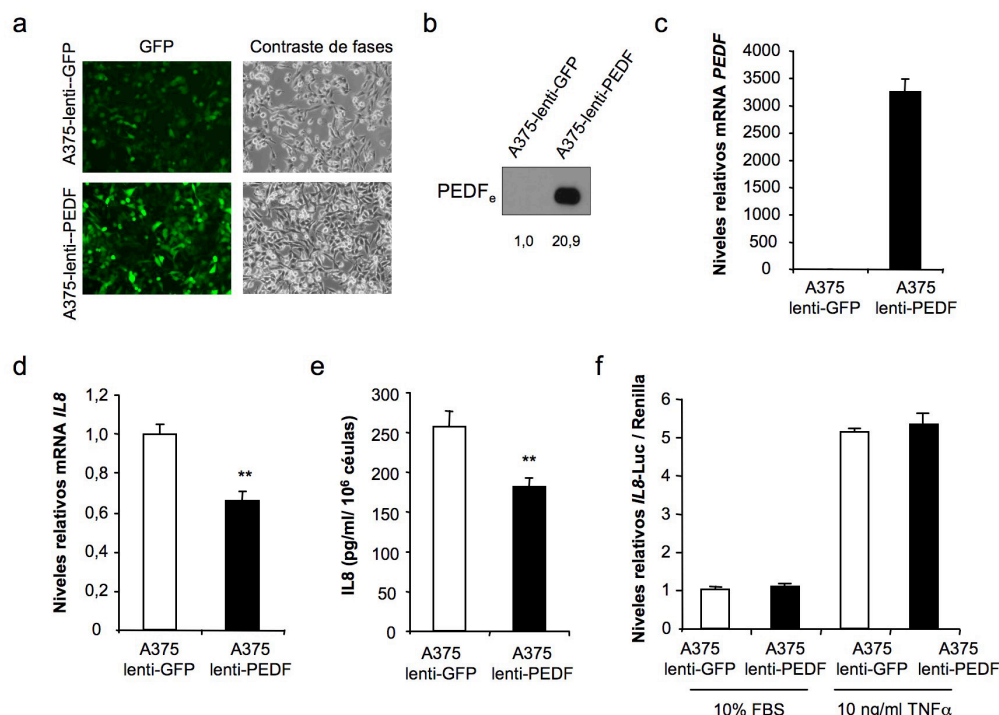


**Figura 40. Regulación de *IL8*, *JAG1* y *MLPH* por PEDF en clones de sobreexpresión de la línea celular de melanoma A375.** (a) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4, A375-pCEP4-PEDF Clon 1 y A375-pCEP4-PEDF Clon 4. Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los de la línea celular A375-pCEP4 tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (b) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *IL8* (panel izquierdo), *JAG1* (panel central) y *MLPH* (panel derecho) en las líneas celulares de melanoma A375-pCEP4, A375-pCEP4-PEDF Clon1 y A375-pCEP4-PEDF Clon4. Se muestran los niveles de mRNA de cada gen relativos a los de la línea celular A375-pCEP4 tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test ANOVA de una vía con comparación múltiple post-test Tukey-Kramer (\*,  $p<0,05$ ; \*\*\*,  $p<0,001$ ).

*IL8* es una citoquina multifuncional esencial en la progresión maligna del melanoma. Se ha descrito que induce angiogénesis, proliferación y migración de células de melanoma (Melnikova and Bar-Eli, 2006). Además, sus niveles correlacionan con el potencial metastásico (Melnikova and Bar-Eli, 2006; Singh *et al.*, 1994) y con peor pronóstico en melanoma (Nurnberg *et al.*, 1999). Por tanto, dada su

importancia en este tipo de cáncer, analizamos en mayor profundidad la regulación de IL8 por PEDF en melanoma.

En primer lugar, evaluamos si la sobreexpresión transitoria de PEDF también disminuía los niveles de IL8. Se modificó la línea celular A375 mediante transducción lentiviral para que toda la población celular expresase niveles elevados de PEDF (Figura 41a), que se comprobaron a las 72 h de la infección mediante *Western blot* de MC (Figura 41b) y RT-PCR cuantitativa (Figura 41c).



**Figura 41. Sobreexpresión transitoria de PEDF en la línea celular de melanoma A375.** (a) Eficiencia de transducción de la línea celular de melanoma A375 tras la infección con lentivirus control (A375-lenti-GFP) o de sobreexpresión de PEDF (A375-lenti-PEDF) a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Las imágenes de fluorescencia muestran que más del 95% de células son GFP positivas a las 72 h de la infección. Se muestran las micrografías de contraste de fases correspondientes a las imágenes de fluorescencia. (b) Análisis por *Western blot* de los niveles de proteína PEDF extracelular (PEDF<sub>e</sub>) en MC de 48 h de la línea celular de melanoma A375 a las 72 h de la transducción con lentivirus-GFP (A375-lenti GFP) o lentivirus-PEDF (A375-lenti PEDF). Los números debajo de las imágenes muestran la cuantificación relativa a la expresión de las células A375-lenti-GFP. (c) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *PEDF* en la línea celular de melanoma A375 a las 72 h de la transducción con lentivirus-GFP (A375-lenti GFP) o lentivirus-PEDF (A375-lenti PEDF). Se muestran los niveles de mRNA de *PEDF* relativos a los las células A375-lenti-GFP tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *IL8* en la línea celular de melanoma A375 a las 72 h de la transducción con lentivirus-GFP (A375-lenti GFP) o lentivirus-PEDF (A375-lenti PEDF). Se muestran los niveles de mRNA de *IL8* relativos a los de las células A375-lenti-GFP tras la normalización con los niveles de *GAPDH*. Las barras representan la media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ). (e) Análisis por ELISA de los niveles de proteína IL8 secretada en MC de 48 h en la línea celular de melanoma A375 a las 72 h de la transducción con lentivirus-GFP (A375-lenti-GFP) o lentivirus-PEDF (A375-lenti-PEDF). Las barras representan la media  $\pm$  DE. Los asteriscos indican valores de probabilidad (p) del test de Student (\*\*,  $p < 0,01$ ). (f) Ensayo de transactivación del promotor de *IL8* en las células de melanoma A375-lenti-GFP y A375-lenti-PEDF tras 24 h de tratamiento con 10% FBS o con 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Se muestran los niveles relativos de luciferasa con respecto a los de las células A375-lenti-GFP en 10% FBS tras corregir por los niveles de renilla. Las barras representan la media  $\pm$  DE.

Al igual que ocurría en las líneas estables anteriormente comentadas, los niveles de mRNA (Figura 41d) y proteína (Figura 41e) de IL8 eran significativamente inferiores en las células que sobreexpresaban PEDF transitoriamente. Además, también se observó una disminución en los niveles de IL8 cuando se analizaron en esas líneas celulares dos semanas después de la transducción lentiviral de PEDF (datos no mostrados).

Por otra parte, se analizó si la disminución de la expresión de IL8 por PEDF ocurría a nivel transcripcional. En experimentos de transactivación del promotor no se observó una disminución significativa de la actividad del promotor de *IL8* en las células que sobreexpresaban PEDF con respecto a las células control, tanto en condiciones basales en presencia de 10% FBS como tras el tratamiento con 10 ng/ml TNF $\alpha$  durante 24 h (Figura 41f). Se utilizó TNF $\alpha$  como un estímulo positivo de inducción del promotor de *IL8*, ya que se ha descrito que el TNF $\alpha$  es un potente inductor transcripcional de *IL8* (Raingeaud and Pierre, 2005). Por lo tanto, la reducción en los niveles de IL8 causada por la sobreexpresión de PEDF no es consecuencia de la regulación de la actividad del promotor de *IL8* por PEDF.



## **DISCUSIÓN**



El melanoma es uno de los cánceres más agresivos que se conocen, cuya incidencia aumenta alarmantemente cada año. Cuando se detecta en sus estadios iniciales, el melanoma se puede curar mediante resección quirúrgica (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Sin embargo, una vez ha progresado al estadio metastásico es extremadamente difícil de tratar, ya que no responde a las terapias actuales (Ch'ng and Tan, 2009). A pesar de varias décadas de investigación molecular y múltiples ensayos clínicos de nuevas drogas que actúan sobre dianas identificadas en estos estudios moleculares, no se han desarrollado tratamientos que consigan mejorar la supervivencia de los pacientes; por lo que continúa siendo imprescindible el identificar nuevas dianas y diseñar nuevas estrategias terapéuticas (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Asimismo, los métodos de diagnóstico y clasificación del melanoma que se utilizan en clínica continúan basándose prácticamente en exclusividad en el examen histopatológico de las lesiones, ya que no se han identificado marcadores moleculares fiables y útiles para distinguir entre los diferentes subtipos de melanoma, o que ayuden a predecir la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento (Larson *et al.*, 2009; Villanueva and Herlyn, 2009).

En un estudio previo del laboratorio se describieron los potentes efectos antitumorales y antimetastásicos de estrategias de transducción retroviral de PEDF en modelos experimentales de melanoma en ratón (García *et al.*, 2004). Posteriores estudios por otros laboratorios han confirmado la acción antitumoral de PEDF en otros tipos de tumores, apoyando el potencial terapéutico de este factor en cáncer (Fernández-García *et al.*, 2007).

En este trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos determinar la posible correlación entre los niveles de expresión de PEDF y la agresividad del melanoma humano, así como la implicación funcional de PEDF en la restricción del proceso de metástasis de este tipo de cáncer. Finalmente, nos interesó profundizar en el mecanismo molecular de acción de PEDF, mediante un análisis global de las variaciones del perfil de expresión génica inducidas por la sobreexpresión de PEDF en líneas celulares de melanoma humano. De esta forma, nos propusimos analizar la validez de PEDF como biomarcador del melanoma, así como su relevancia en la progresión maligna del melanoma humano.

## **1. Pérdida de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano. Implicaciones funcionales**

### **1.1. PEDF se expresa a niveles elevados en los melanocitos cutáneos: implicaciones funcionales en la biología del melanocito**

Utilizando cultivos primarios hemos mostrado que PEDF se expresa a niveles elevados en los melanocitos y fibroblastos cutáneos, pero no en queratinocitos ni células endoteliales. Este factor fue inicialmente aislado a partir de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), aunque posteriormente se mostró que se expresa en muchos otros tipos celulares (Fernández-García *et al.*, 2007; Filleur *et al.*, 2009). En un trabajo simultáneo al inicio de esta Tesis se muestra que PEDF se

produce a un cierto nivel en los melanocitos cutáneos (Abe *et al.*, 2004), aunque no se analiza de forma comparativa la expresión de este factor en los melanocitos y en otros tipos celulares constituyentes de la piel. Los altos niveles PEDF producidos por los fibroblastos dérmicos concuerdan con otros estudios en los que se sugiere que este factor podría estar implicado en el control de la proliferación de este tipo de células (Francis *et al.*, 2004; Tresini *et al.*, 1999).

Mediante una estrategia de RNA de interferencia mostramos que el silenciamiento de la expresión de PEDF aumenta las propiedades migratorias, invasivas y proliferativas de los melanocitos, por lo que PEDF podría participar en la regulación de aspectos clave de la biología del melanocito. Se ha descrito que PEDF tiene múltiples funciones, algunas de las cuales son específicas de algunos tipos celulares, como sus propiedades neurotróficas o neuroprotectoras, mientras que otras afectan a muchos tipos celulares, como la inhibición de proliferación y migración e inducción de apoptosis (Fernández-García *et al.*, 2007). Los melanocitos se originan a partir de precursores de la cresta neural con elevadas capacidades migratorias y proliferativas (Gupta *et al.*, 2005; Zbytek *et al.*, 2008) que, en los melanocitos, se encuentran estrechamente reguladas por el control que ejercen los queratinocitos epidérmicos (Hsu *et al.*, 2002). Nuestros resultados sugieren que la producción de PEDF por los melanocitos podría ser un mecanismo adicional para el control y restricción de su alto potencial migratorio y proliferativo (Figura 42). Adicionalmente, sería razonable pensar que PEDF podría estar controlando la vascularización de la piel, teniendo en cuenta antecedentes previos en los que se muestra que la ausencia de PEDF en ratones provoca una vascularización excesiva de múltiples órganos (Doll *et al.*, 2003).

## **1.2. Pérdida de la expresión de PEDF como huella de agresividad e invasividad en el melanoma**

Dado que los melanocitos expresan niveles elevados de PEDF, nos interesó estudiar si la expresión de este factor se modula durante la progresión maligna del melanoma, al igual que ocurre en otros tipos de cáncer (Fernández-García *et al.*, 2007). No obstante, definir la progresión del melanoma es una tarea complicada, debido a la gran heterogeneidad de esta enfermedad (Ch'ng and Tan, 2009; Hoek, 2009), así como a la dificultad en la clasificación de algunas lesiones. Por ello, decidimos emplear distintos abordajes para establecer sólidamente si existe una correlación entre la expresión de PEDF y el grado de malignidad o progresión en el melanoma.

En primer lugar, el análisis de la expresión de PEDF en líneas celulares establecidas a partir de biopsias de melanoma de distintos estadios histopatológicos muestra que algunas líneas celulares establecidas a partir de lesiones RGP o VGP mantienen niveles elevados de PEDF similares a los de los melanocitos, mientras que la mayoría de las líneas celulares aisladas de metástasis no expresan PEDF. La caracterización adicional de esta serie de líneas celulares utilizando una combinación de marcadores moleculares (E-cadherina, N-cadherina, MITF) y funcionales (migración e invasividad) permite

explicar algunas de las excepciones encontradas. Por ejemplo, mediante esta combinación de criterios moleculares y funcionales pudimos subclasificar nuestra colección de líneas derivadas de metástasis e identificar que la única línea celular que mantiene niveles elevados de expresión de PEDF se corresponde con la línea celular menos agresiva (Herlyn *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001b). Sin embargo, esta combinación de criterios no permitió establecer una correlación en la colección de líneas celulares de menor agresividad (RGP y VGP), lo que podría deberse, en parte, a que sólo disponíamos de dos líneas celulares de cada subtipo. Adicionalmente, consideramos que la variabilidad encontrada en la expresión de PEDF dentro del grupo de líneas RGP y VGP podría reflejar, por un lado, diferencias importantes entre la agresividad de la lesión original y la línea celular derivada y, por otro lado, el hecho de que la clasificación histopatológica de algunos tumores no siempre refleja correctamente la agresividad real de dichas células malignas. Ya se ha comentado que la clasificación de las lesiones en función del grosor es uno de los criterios más utilizados (Fecher *et al.*, 2007), pero frecuentemente se encuentran melanomas con un grosor muy pequeño que desarrollan metástasis rápidamente, mientras que un porcentaje significativo de lesiones de grosor elevado no metastatizan (Lomuto *et al.*, 2004).

Considerando las limitaciones encontradas en el abordaje anterior, utilizamos una segunda aproximación basada en la perspectiva de clasificación molecular del melanoma mediante análisis global de expresión génica en series amplias de líneas celulares de melanoma. En estos estudios se clasifican los melanomas en grupos según su grado de agresividad establecido en base a las diferencias en sus perfiles de expresión génica. Inicialmente confirmamos que la expresión de PEDF disminuye significativamente al comparar el conjunto de líneas celulares de melanoma con los cultivos de melanocitos incluidos en estos estudios globales. Recientemente se han publicado los datos de un meta-análisis en el que se comparan los datos de expresión génica de una colección de 28 cultivos primarios de melanocitos frente a cinco series grandes de líneas celulares de melanoma (Hoek, 2007). Mediante esta comparación se han identificado 86 genes con expresión disminuida y 150 genes con expresión aumentada de forma consistente en todas las series de líneas celulares de melanoma incluidas en el meta-análisis, respecto a los melanocitos primarios. En el listado de genes cuya expresión disminuye ordenados en función del grado de regulación en la comparación entre melanocito y melanoma, PEDF ocupa la posición 21 de los 86 genes seleccionados como huella molecular de genes cuya expresión disminuye en el melanoma. Los resultados de este meta-análisis demuestran que existe una correlación robusta entre la pérdida de expresión de PEDF y la progresión maligna del melanoma.

A continuación, utilizamos esta perspectiva de clasificación molecular con el objetivo de encontrar nuevos criterios que nos permitieran establecer los principios que subyacen a la variabilidad encontrada en la expresión de PEDF en el melanoma. La combinación del análisis del perfil de expresión génica con ensayos funcionales permite clasificar series grandes de líneas celulares de melanoma en dos cohortes, que se corresponden, respectivamente, con el perfil/fenotipo proliferativo y el perfil/fenotipo invasivo (Hoek *et al.*, 2006). En este tipo de análisis encontramos que PEDF se expresa a niveles elevados en el cohorte de las líneas celulares de perfil proliferativo, mientras que su

expresión se pierde en el cohorte de las líneas celulares de perfil invasivo. Estos criterios de clasificación nos permitieron establecer una correlación más robusta entre la expresión de PEDF y la agresividad e invasividad del melanoma, puesto que en todas las series analizadas se observa una menor expresión de PEDF en las líneas celulares con perfil invasivo.

En tercer lugar, nos planteamos si la expresión elevada de PEDF en algunas líneas celulares establecidas a partir de metástasis podría ser una consecuencia de la reprogramación de la expresión de este factor durante el proceso de metástasis de melanoma. En el análisis que realizamos en las líneas celulares C8161 y C81-61, derivadas de una única metástasis en la pared abdominal de un paciente con melanoma cutáneo y que presentan fenotipos funcionales opuestos en relación con su agresividad; la expresión de PEDF está restringida a las células poco agresivas C81-61. La existencia en una lesión de melanoma de células positivas y negativas para la expresión de PEDF podría reflejar la reprogramación de este factor como consecuencia de las transiciones reversibles entre los estadios proliferativo e invasivo durante el proceso metastásico, según el modelo del *phenotype switching* (Hoek, 2009; Hoek *et al.*, 2008). Las células de melanoma que expresan PEDF serían las células de perfil proliferativo, mientras que en las células de perfil invasivo no se expresaría PEDF. El análisis mediante inmunohistoquímica de biopsias de metástasis de melanoma en nódulo linfático y dermis nos permitió poner de manifiesto que la expresión de PEDF es heterogénea en lesiones de pacientes de melanoma. Adicionalmente se confirmó la tendencia observada en nuestros abordajes anteriores de pérdida de la expresión de PEDF asociada a la malignización; ya que solamente una de cada cinco biopsias procedentes de metástasis de melanoma presenta niveles de expresión elevados de este factor.

Existen diversas evidencias en modelos experimentales *in vivo* que apoyan el fenómeno de la reprogramación del melanoma. K. Hoek y colaboradores observaron que tras la inyección subcutánea de células de melanoma de perfil proliferativo (MITF-positivas) o células de perfil invasivo (MITF-negativas) en ratones inmunodeprimidos, los tumores que se formaban eran indistinguibles en cuanto a la expresión de MITF (Hoek *et al.*, 2008). En ambos casos, los tumores presentaban una expresión heterogénea de MITF, al igual que se observa en biopsias de pacientes de melanoma (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008); lo que sugiere que se habrían producido reprogramaciones génicas *in vivo*, dando como resultado cambios bidireccionales en la firma molecular hacia un fenotipo u otro. M. Hendrix y colaboradores han puesto de manifiesto utilizando modelos embrionarios la capacidad del microentorno para reprogramar al melanoma, conduciendo a cambios significativos en la agresividad (Hendrix *et al.*, 2007; Postovit *et al.*, 2006). Este mismo grupo ha desarrollado modelos *in vitro* que permiten analizar el potencial de la matriz extracelular para reprogramar las células de melanoma o, incluso, los melanocitos. Resultados preliminares de nuestro grupo en colaboración con M. Hendrix indican que la elevada expresión de PEDF característica de melanocitos primarios se puede reprogramar al crecerlos en matrices de colágeno precondicionadas por células de melanoma muy agresivas (ver apartado 1.4 de la Discusión).

En el modelo que proponemos de regulación de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano, un melanoma primario estaría compuesto inicialmente por células de fenotipo proliferativo y positivas para la expresión de PEDF. Algunas células de perfil proliferativo se pueden reprogramar por señales del microentorno a células de fenotipo invasivo, en las que la expresión de PEDF estaría disminuida. A medida que el tumor primario evoluciona, se van acumulando células que han experimentado este tipo de reprogramaciones, dando lugar eventualmente a un tumor compuesto por una mezcla heterogénea de células de melanoma de los dos fenotipos y, por lo tanto, heterogénea en relación a la expresión de PEDF (Figura 42).

### **1.3. Implicaciones funcionales de la pérdida de expresión de PEDF en la progresión metastásica del melanoma**

Los distintos abordajes empleados nos han permitido establecer que existe una correlación entre la pérdida de expresión de PEDF y el aumento de agresividad de las líneas celulares de melanoma, lo cual sugiere que la modulación de la expresión de PEDF podría ser crítica durante el proceso de metástasis del melanoma.

Con el objetivo de evaluar las consecuencias funcionales de la pérdida de expresión de PEDF durante la progresión maligna del melanoma, así como para establecer una relación causal entre los niveles de PEDF y la agresividad del melanoma, utilizamos un análisis molecular directo basado en una estrategia de RNA de interferencia. El silenciamiento de la expresión endógena de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas aumenta su capacidad migratoria e invasiva y se traduce en un mayor potencial metastásico *in vivo*. Estos resultados complementan datos previos de nuestro laboratorio y, posteriormente, de otros grupos, en los que se mostró, mediante una estrategia de sobreexpresión, la capacidad de PEDF para restringir la migración e invasión de las células de melanoma, y que estos mecanismos subyacen al potente efecto antitumoral y antimetastásico *in vivo* de PEDF (Fernández-García *et al.*, 2007; García *et al.*, 2004).

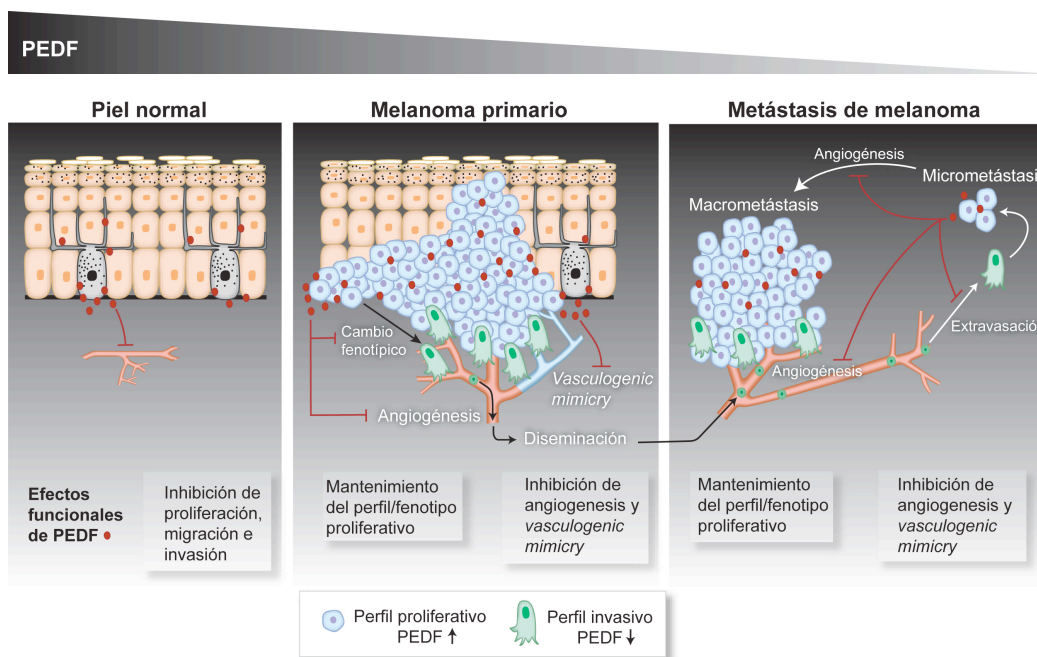
Adicionalmente, otras propiedades funcionales moduladas por la interferencia de la expresión de PEDF, como el potencial angiogénico (García *et al.* 2004), podrían estar contribuyendo al aumento en la capacidad metastásica al silenciar la expresión de PEDF.

En algunos de los nuevos modelos de progresión tumoral se postula que la adquisición de propiedades invasivas y proliferativas ocurre de forma secuencial y excluyente. Es decir, aquellas células del tumor que adquieren un fenotipo migratorio e invasivo se encuentran en un estado de parada proliferativa, mientras que las células que proliferan activamente tienen un potencial migratorio restringido. Sin embargo, a pesar de que la interferencia de PEDF aumenta significativamente el potencial migratorio y la capacidad invasiva de células de melanoma, en experimentos preliminares no hemos encontrado diferencias significativas en la proliferación de células de melanoma tras el silenciamiento de PEDF.

En este trabajo, además, hemos determinado por primera vez el efecto de PEDF en la formación de metástasis espontáneas a partir de un tumor primario subcutáneo. Aunque la mayoría de las líneas celulares disponibles de melanoma humano no son capaces de dar lugar a la formación de metástasis cuando se inyectan subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos, la línea celular altamente agresiva C8161 sí es capaz de formar metástasis hacia diferentes órganos diana (Welch *et al.*, 1991). Por lo tanto, este modelo nos ha permitido analizar el efecto de PEDF en las etapas iniciales de la metástasis (invasividad local desde el tumor primario e intravasación) que no están representadas en el modelo de inyección de células de melanoma en la vena de la cola. Observamos que la sobreexpresión de PEDF reduce significativamente el número de metástasis espontáneas en el pulmón y el hígado. Adicionalmente mostramos que el silenciamiento de PEDF aumenta notablemente la formación de metástasis espontáneas de las células de melanoma poco agresivas C81-61. Estos resultados en conjunto ponen de manifiesto el potencial de PEDF para restringir las etapas iniciales de la cascada metastásica.

PEDF afecta a otras propiedades características de los melanomas agresivos, como la capacidad de las células de melanoma de formar canales vasculogénicos (*vasculogenic mimicry* (VM)). Esta propiedad funcional es consecuencia de la alta plasticidad que caracteriza a las células de melanoma agresivas, que les permite mimetizar funciones propias de las células endoteliales (Hendrix *et al.*, 2003). El silenciamiento de PEDF permite que las células de melanoma poco agresivas C81-61 formen estructuras tubulares cuando se cultivan sobre matrices de colágeno. Sorprendentemente, la ausencia de PEDF permite que estas células residan en el pulmón formando redes tubulares tras su inyección en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos. Por lo tanto, la ausencia de PEDF confiere a las células C81-61 una propiedad característica de células de melanoma agresivas. En consonancia con estos resultados, encontramos que la sobreexpresión de PEDF inhibe la capacidad de VM, tanto *in vitro* como *in vivo*, que caracteriza a la línea celular de melanoma altamente agresiva C8161. En nuestra opinión, es especialmente relevante esta habilidad de PEDF para impedir el VM, puesto que se ha mostrado que otros inhibidores de angiogénesis como anginex, TNP-470 y endostatina son incapaces de bloquear el VM en células de melanoma agresivas, entre ellas las C8161 (van der Schaft *et al.*, 2004). Existen estudios previos en los que se han identificado varias moléculas que pueden estar implicadas en la capacidad de VM de las células de melanoma. En concreto, se han descrito varias moléculas propias de las células endoteliales, como VE-cadherina o el receptor de efrinas A2 (EphA2), cuya expresión se adquiere por las células de melanoma con capacidad vasculogénica (Hendrix *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2007; Seftor *et al.*, 2002). Recientemente se ha observado que la interferencia de galectina 3 (LGALS3) en células de melanoma disminuye la capacidad de VM y reduce la expresión de moléculas implicadas en el VM, como VE-cadherina (Mourad-Zeidan *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de PEDF en líneas celulares de melanoma disminuye la expresión de *LGALS3* en melanoma, lo que sugiere que la modulación de este factor por PEDF podría estar mediando la inhibición del VM por PEDF.





**Figura 42. Modelo de regulación de PEDF en la progresión maligna del melanoma humano y efectos funcionales de PEDF en el melanocito y el melanoma.** En la piel normal, los melanocitos cutáneos producen niveles elevados de PEDF. En este contexto fisiológico, PEDF contribuye a restringir la capacidad migratoria y el potencial proliferativo de los melanocitos y, probablemente, la vascularización de la piel. Adicionalmente, PEDF podría regular otras propiedades biológicas más específicas del linaje melanocítico, como la melanogénesis. En el contexto de melanoma, la expresión de PEDF se regula por mecanismos aún no caracterizados que determinan niveles de expresión altos en las células de perfil proliferativo y bajos en las células de perfil invasivo. La progresión del melanoma está dirigida por la alternancia de los fenotipos proliferativo e invasivo y, por lo tanto, implica la reprogramación de la expresión de PEDF. La expresión elevada de PEDF en las células de fenotipo proliferativo restringe sus propiedades migratorias e invasivas, el potencial angiogénico, y la capacidad de formar redes vasculogénicas (*vasculogenic mimicry*). Mediante la combinación de estos efectos funcionales PEDF limita la progresión de la lesión primaria. Sin embargo, la pérdida de expresión de PEDF en las células de fenotipo invasivo contribuye a la adquisición de las propiedades funcionales necesarias para la cascada metastásica. La formación de micrometástasis de melanoma en órganos distantes requiere la reprogramación desde el fenotipo invasivo al proliferativo, lo cual implicará una reprogramación adicional que conduzca a la reexpresión de PEDF. En consecuencia, este modelo predice que la expresión de PEDF en los melanomas primarios y en las metástasis de melanoma es heterogénea. Adicionalmente, deben de existir otros mecanismos aún no caracterizados que determinen la pérdida de la expresión de PEDF en las metástasis de melanoma.

En conclusión, la reprogramación de la expresión de PEDF es relevante para la alternancia entre los fenotipos proliferativo e invasivo que conducen la progresión metastásica del melanoma. PEDF contribuye a determinar el fenotipo proliferativo en el melanoma primario, restringiendo las propiedades migratorias e invasivas, el potencial angiogénico, y la capacidad de formar redes vasculogénicas (*vasculogenic mimicry*); aspectos que, en global, condicionan un menor potencial metastásico. En cambio, la pérdida de expresión de PEDF es necesaria para la reprogramación hacia el fenotipo invasivo, y contribuye a la adquisición de las propiedades requeridas para la cascada metastásica. Posteriormente, en la lesión metastásica algunas de las células de fenotipo invasivo pueden reprogramarse por las señales del nuevo microentorno hacia células de fenotipo proliferativo, lo que implica la reexpresión de PEDF. Estas células formarán micrometástasis que, eventualmente, darán lugar a macrometástasis, en las que acontecerían ciclos adicionales de reprogramación que originarán una lesión metastásica en la que la expresión de PEDF es heterogénea (Figura 42). Adicionalmente,

deben de existir otros mecanismos aún no caracterizados que determinen la pérdida de la expresión de PEDF en las metástasis de melanoma.

Se han descrito otros marcadores moleculares del melanoma para los que se superponen mecanismos de reprogramación y de pérdida de expresión en la progresión maligna del melanoma, como MITF. La expresión de MITF es heterogénea en melanomas primarios, lo cual podría reflejar la presencia de células de fenotipo proliferativo (niveles altos de MITF) e invasivo (niveles bajos de MITF) en una lesión primaria. Adicionalmente se ha descrito una tendencia a la pérdida de expresión de MITF en biopsias de metástasis de melanoma en comparación con melanomas primarios, así como una correlación inversa entre MITF y agresividad del melanoma (Carreira *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2008).

En este trabajo evaluamos, adicionalmente, si los efectos funcionales observados tras la interferencia de PEDF, como la mayor migración, invasión y proliferación, podrían estar mediados por la modulación de algunas moléculas y rutas implicadas en la progresión maligna del melanoma, como E-cadherina (Haass *et al.*, 2005), MITF (Levy *et al.*, 2006) o la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (O'Connell and Weeraratna, 2009). Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de PEDF en melanocitos primarios y en líneas celulares de melanoma no implica cambios significativos en la expresión de E-cadherina o MITF; ni afecta a la translocación de la  $\beta$ -catenina al núcleo promovida por un estímulo tan potente como el LiCl. No se puede descartar que el efecto de PEDF sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina fuese anterior a la acción de la GSK-3 $\beta$ , por lo que se podrían utilizar activadores endógenos de la vía, como Wnt1 o Wnt3, y analizar si el silenciamiento de PEDF afecta al funcionamiento de la ruta.

Otros mecanismos alternativos que podrían estar mediando los efectos de PEDF en la migración e invasión serían: la competición de PEDF con las integrinas por la unión a componentes de la matriz extracelular, como se ha demostrado que ocurre en células de carcinoma colorrectal (Kozaki *et al.*, 1998); o mediante los efectos de PEDF en la producción de factores quimiotácticos y mitogénicos (García *et al.*, 2004). Una mayor expresión de factores mitogénicos podría explicar también el aumento en proliferación de los melanocitos tras el silenciamiento de PEDF.

En conclusión, el mecanismo molecular que media los efectos funcionales de PEDF en el melanoma no se basa en la interferencia con los factores o rutas identificadas previamente como esenciales para el control de la malignización del melanoma, por lo que sería necesario identificar los mecanismos en los que se basan las acciones específicas de PEDF en las células de melanoma y en los melanocitos.

#### **1.4. Mecanismos reguladores de la expresión de PEDF en la progresión maligna del melanoma**

Para entender en mayor profundidad cómo ocurren los cambios en la expresión de PEDF durante la transformación y progresión maligna del melanoma, es necesario identificar los mecanismos

que determinan los niveles de expresión de PEDF durante la malignización de este tipo de lesiones. En el trabajo mostrado en esta Tesis hemos puesto de manifiesto que PEDF podría estar regulado por dos tipos generales de mecanismos: reprogramación y pérdida de expresión. Los mecanismos de reprogramación de PEDF, en el contexto del modelo del *phenotype switching*, contribuirían a determinar la alternancia de los fenotipos proliferativo e invasivo. De forma paralela a este mecanismo, pueden participar otros mecanismos, en consonancia con la hipótesis de evolución clonal, que determinen la pérdida de la expresión de este factor a medida que las lesiones evolucionan hacia el estadio metastásico.

Entre los posibles mecanismos de reprogramación, podríamos considerar las señales del microentorno y la hipoxia. El estudio de la expresión de PEDF durante la maduración y migración de los precursores de los melanocitos durante el desarrollo desde la cresta neural hacia la epidermis permitiría explorar, en un contexto fisiológico, la relación entre potencial migratorio y grado de diferenciación y la expresión de PEDF; e identificar los posibles factores implicados en el control de la expresión de PEDF en los diferentes ambientes embrionarios que se encuentran los precursores neurales en su camino hacia la epidermis. Es probable que algunos de esos factores sean los que estén regulando la expresión de PEDF en las células de melanoma, teniendo en cuenta que frecuentemente las células tumorales activan vías de señalización y utilizan mecanismos de regulación propios de células progenitoras.

En el contexto del melanocito, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la expresión de PEDF se puede reprogramar por señales que proceden del microambiente tumoral. En colaboración con el grupo de M. Hendrix, hemos observado que cuando se crecen melanocitos primarios sobre una matriz de colágeno preconditionada por células de melanoma muy agresivas C8161, estos melanocitos adquieren un fenotipo más invasivo y la expresión de *PEDF* disminuye aproximadamente nueve veces con respecto a melanocitos crecidos en una matriz control no preconditionada (Seftor *et al.*, 2005). Esta reprogramación, no obstante, es reversible, ya que los melanocitos recuperan su fenotipo y perfil de expresión génica normales tras ser retirados de la matriz preconditionada.

El factor de transcripción MITF y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina son reguladores clave de la alternancia de fenotipos que dirige la progresión del melanoma en el modelo del *phenotype switching*, por lo que ambos son candidatos interesantes a explorar como posibles reguladores de los niveles de expresión de PEDF durante la progresión del melanoma. En las células de perfil proliferativo, MITF y/o los factores Wnt estimuladores podrían ser responsables de mantener los niveles de expresión de PEDF elevados, característicos de este perfil (Hoek *et al.*, 2006). La transición hacia el fenotipo invasivo se origina en respuesta a señales extracelulares tipo TGF $\beta$  o antagonistas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina como DKK1, que podrían estar implicados en la disminución de la expresión de PEDF.

La hipoxia es otro de los reguladores relevantes en la progresión tumoral, al inducir la angiogénesis y otra serie de cambios epigenéticos que favorecen la adquisición de un fenotipo más

agresivo (Brahimi-Horn *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2009). Se ha descrito que la hipoxia disminuye los niveles de PEDF en células de retinoblastoma (Dawson *et al.*, 1999) y en células RPE (Notari *et al.*, 2005). En resultados no mostrados en esta Tesis, encontramos que la hipoxia regula negativamente la expresión de PEDF en melanocitos primarios y en líneas celulares de melanoma. Varios trabajos recientes han demostrado que la hipoxia es un factor clave en la transformación maligna de los melanocitos (Adams *et al.*, 2006; Bedogni *et al.*, 2005), por lo que podría ser uno de los mecanismos implicados en la pérdida de expresión de PEDF en la progresión del melanoma.

En cuanto a los mecanismos que pueden determinar la pérdida de la expresión de PEDF a medida que las lesiones evolucionan hacia el estadio metastásico, se pueden distinguir mecanismos genéticos y epigenéticos.

En el cáncer la expresión de muchos factores reguladores de la neovascularización está controlada a través de la ganancia de oncogenes y la pérdida de los genes supresores tumorales (Bouck, 1990). Por ejemplo, la pérdida del gen supresor *p53* determina la disminución de los niveles del antiangiogénico TSP-1 (Dameron *et al.*, 1994). Se ha descrito que PEDF es una diana directa de *p63* y *p73*, dos miembros de la familia de *p53*, en líneas celulares de cáncer colorrectal (Sasaki *et al.*, 2005). Además, se ha observado una correlación inversa entre los niveles de PEDF y la expresión de la isoforma oncogénica  $\Delta$ EX2*p73* o con mutaciones oncogénicas en *KRAS* en cáncer colorrectal humano (Díaz *et al.*, 2008). Con respecto al melanoma, a pesar de anteriores evidencias que descartaban la implicación de *p73* en la tumorigénesis de este tipo de cáncer (Tsao *et al.*, 1999), recientemente se ha demostrado que la isoforma TA-*p73* inhibe el crecimiento independiente de anclaje a través de la activación de la proteína KCNK1, cuya expresión disminuye en el melanoma con respecto a la piel normal (Beitzinger *et al.*, 2008), por lo que sería interesante explorar si *p73* está implicado en la regulación de la expresión de PEDF durante la progresión del melanoma.

Los melanomas humanos presentan mutaciones oncogénicas en *NRAS* (20% melanomas) y *BRAF* (50-70% melanomas) que suponen una ventaja proliferativa al inicio de la transformación maligna, al desacoplar el crecimiento celular de las señales mitogénicas externas (Chin, 2003). Mediante un análisis de datos de *microarrays* de líneas celulares de melanoma, disponibles en la base de datos GEO, no se observó correlación entre los niveles de expresión de PEDF y las mutaciones en *BRAF* o *NRAS*.

La pérdida de expresión de PEDF podría ser consecuencia del silenciamiento epigenético por metilación de su promotor. Recientemente se ha descrito que otro miembro de la familia de las serpinas, la maspina (*SERPINB5*), se expresa a niveles elevados en los melanocitos, pero se encuentra silenciado por mecanismos epigenéticos en *naevi* y melanomas (Denk *et al.*, 2007). También se ha descrito el silenciamiento epigenético de maspina en células de adenocarcinoma de mama (Domann *et al.*, 2000).

Por otro lado, el análisis de la expresión de PEDF en células madre adultas puede aportar pistas fundamentales sobre otras propiedades funcionales de PEDF o sobre mecanismos de regulación adicionales durante la diferenciación de estos progenitores hacia células más maduras. En el trabajo de

Ramírez-Castillejo y colaboradores se demuestra que PEDF juega un papel fundamental en mantener el nicho de células madre de la zona subventricular del cerebro. PEDF se secreta en este nicho por las células endoteliales y endimarias, y contribuye a mantener la capacidad de auto-renovación de las células madre neurales adultas de la zona subventricular, que no expresan PEDF (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que estas células madre neurales se dividen muy lentamente, se ha sugerido que el PEDF secretado por células del nicho participa en el mantenimiento del estado de “semi-quiescencia” característico de estas poblaciones de células madre (Pumiglia and Temple, 2006).

Recientemente se ha descrito que los progenitores del epitelio intestinal de la base de las criptas colónicas expresan niveles de PEDF inferiores a los de las células más diferenciadas de la parte superior de las criptas (Doyon *et al.*, 2009). También se ha encontrado que las células madre mesenquimales secretan niveles bajos de PEDF (Arnhold *et al.*, 2006; Sarojini *et al.*, 2008), y que su expresión aumenta según se van diferenciando estos progenitores hacia otros linajes celulares (Chiellini *et al.*, 2008). En la piel, el nicho de células madre se localiza en la zona del *bulge*, una región que está localizada detrás de la parte permanente del folículo, por debajo de la glándula sebácea (Moore and Lemischka, 2006). Esta población de células madre da lugar a los melanocitos diferenciados ubicados en la papila dérmica del bulbo piloso y en el estrato basal de la epidermis (Lin and Fisher, 2007). Sería interesante analizar cómo se regula la expresión de PEDF durante la maduración de las células madre del *bulge* para dar lugar a células del linaje melanocítico.

En los últimos años se ha mostrado que en los tumores existen subgrupos de células “iniciadoras tumorales” o *cancer stem cells* (CSCs), con una alta agresividad y capacidad para iniciar tumores, que presumiblemente estarían dirigiendo el crecimiento del tumor y podrían diferenciarse para dar lugar a las células “no iniciadoras” y más diferenciadas de la lesión (Schatton and Frank, 2008). Dada la correlación inversa que hemos encontrado entre la expresión de PEDF y la agresividad del melanoma, sería muy interesante analizar los niveles de expresión de PEDF en las células teóricamente más agresivas del tumor, las CSCs, en comparación con el resto de células del tumor más diferenciadas. Paradójicamente, en un estudio reciente del grupo de R. Weinberg, datos no validados de un análisis global de la expresión génica muestran que la expresión de *PEDF* está aumentada en las CSCs de mama, células tumorales muy invasivas que han sufrido una transición epitelio-mesénquima, con respecto a las células normales (Gupta *et al.*, 2009b). Este resultado estaría en desacuerdo con lo que se conoce de PEDF actualmente, ya que la expresión de PEDF es característica de células más diferenciadas y con una baja capacidad invasiva.

En un intento de conciliar el modelo del *phenotype switching* con el modelo de las CSCs en melanoma, recientemente se ha analizado la expresión del marcador de CSCs de melanoma ABCB5 (Schatton *et al.*, 2008) en los cohortes proliferativo o invasivo, y se ha mostrado que las líneas celulares de perfil proliferativo presentan mayores niveles de expresión de *ABCB5* que las líneas celulares de perfil invasivo; lo que implicaría que las células de perfil proliferativo estarían enriquecidas en CSCs (Hoek *et al.*, 2009). Sin embargo, este dato estaría en desacuerdo con el estudio de Gupta y

colaboradores y con el propio modelo de las CSCs, en el que se postula que las CSCs serían las células de la lesión con una baja capacidad proliferativa pero con un alto potencial tumorigénico e invasivo, que les permitiría formar tumores y, eventualmente, originar metástasis.

El campo de las CSCs está aún muy incipiente, ya que existe un gran debate en relación con la identificación y caracterización funcional de las CSCs, y se llega a cuestionar, incluso, la propia existencia de las CSCs en algunos tipos de cáncer (Gupta *et al.*, 2009a; Shackleton *et al.*, 2009). Por tanto, sería necesario validar estos intrigantes resultados y estudiar en mayor profundidad la posible implicación funcional de PEDF en la biología de las CSCs. No se debería descartar, además, la posibilidad de que los efectos de PEDF sobre las CSCs fuesen diferentes a los ya descritos sobre las células madre normales o sobre líneas celulares tumorales.

## 2. Genes regulados por PEDF en la línea celular de melanoma humano A375

Los potentes y diversos efectos directos de PEDF sobre las células tumorales, además de sus acciones sobre la vasculatura tumoral, permiten considerar a PEDF como un posible agente en la terapia antitumoral, y más específicamente en melanoma, cáncer especialmente resistente a todas las terapias actuales. Sin embargo, esto implica conocer los mecanismos moleculares involucrados en mediar los diversos efectos directos de PEDF sobre las células de melanoma. En este trabajo describimos las variaciones que produce PEDF en el perfil de expresión génica cuando es reintroducido en una línea celular de melanoma agresiva.

En general, PEDF disminuye la expresión de multitud de genes implicados en procesos básicos en la biología del melanoma, reflejando varias de las propiedades funcionales descritas para este factor. En primer lugar, varios factores proangiogénicos y promigratorios ven disminuida su expresión cuando se sobreexpresa PEDF, de acuerdo a datos previos de nuestro laboratorio en los que se describían las propiedades antiangiogénicas y antimigratorias de este factor sobre las células de melanoma (García *et al.*, 2004). Los cambios en la expresión de estos genes determinan una menor capacidad de las células de melanoma para activar la vascularización de la lesión tumoral. La sobreexpresión de PEDF disminuye los niveles de mRNA de *VEGF* en un factor inferior a 2, por lo que no superó el criterio de selección tan restrictivo que impusimos para considerar genes regulados. No obstante, se ha descrito que en la modulación de VEGF por PEDF probablemente participan mecanismos postranscripcionales, ya que la regulación de la proteína es de mayor magnitud que la regulación del mRNA de *VEGF* (García *et al.*, 2004). Un estudio reciente de análisis de expresión génica en células de carcinoma de próstata tratadas con PEDF recombinante ha mostrado también la disminución de la expresión de varios genes relacionados con angiogénesis tras el tratamiento con PEDF (Liu *et al.*, 2009). En nuestro estudio PEDF disminuye la expresión de interleuquina 8 (IL8), una citoquina multifuncional con propiedades proangiogénicas, proproliferativas y promigratorias (Melnikova and Bar-Eli, 2006), y cuyos niveles de expresión correlacionan con el potencial metastásico y la agresividad del melanoma (Nurnberg *et al.*,

1999; Singh *et al.*, 1994). El mRNA y la proteína IL8 disminuyen significativamente tras la sobreexpresión transitoria de PEDF y en líneas estables de sobreexpresión de este factor. Observamos, además, que la disminución de los niveles de IL8 por PEDF no ocurre a nivel transcripcional. Se ha utilizado una construcción del promotor que comprende los 2000 pb anteriores al inicio de transcripción y que contiene sitios de unión para diversos factores de transcripción, como AP-1, NF- $\kappa$ B, C/EBP/NF-IL6 o STAT-6 (Liu *et al.*, 2005; Raingeaud and Pierre, 2005), siendo éstos suficientes para activar la expresión de IL8 por hipoxia (Xu *et al.*, 1999), pH ácido (Xu and Fidler, 2000), TNF $\alpha$  e IL1 (Mukaida *et al.*, 1990). Aunque se ha implicado al factor NF- $\kappa$ B como mediador intracelular de PEDF en células neuronales, PEDF podría estar utilizando distintas moléculas de señalización intracelulares y distintos factores de transcripción dependiendo del tipo celular sobre el que esté actuando e, incluso, a través de otros sitios de unión al promotor no contenidos en la construcción utilizada. No obstante, el mecanismo de regulación de la expresión de IL8 por PEDF podría ser exclusivamente postranscripcional.

Adicionalmente, PEDF modula la expresión de moléculas de adhesión y moléculas relacionadas con la matriz extracelular, lo que podría explicar también el efecto inhibitor de este factor sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células de melanoma. Como ejemplos, PEDF disminuye la expresión del colágeno IV (*COL4A2*), componente fundamental de la membrana basal y con un papel importante en la angiogénesis y en la promoción de la adhesión y migración celulares (Kalluri, 2003; Pasco *et al.*, 2005). Además, PEDF aumenta la expresión de fibronectina (FN1), una proteína de la matriz extracelular implicada en la adhesión, proliferación y migración celulares a través de su unión a las integrinas. El aumento de la expresión de *FN1* por PEDF podría conducir a una mayor adhesión celular que determinaría una menor capacidad invasiva de las células de melanoma. Recientemente se ha descrito que la interferencia de FN1 en células de cáncer de tiroides aumenta el crecimiento tumoral y la formación de metástasis (Liu *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de PEDF modula, además, varios genes descritos en otros estudios como implicados en la progresión maligna del melanoma humano, como varios genes de la ruta Notch (*NOTCH2NL*, *JAG1*) (Pinnix and Herlyn, 2007) o de la vía Wnt (*WNT5A*, *DKK1*, *LEF1*) (O'Connell and Weeraratna, 2009). PEDF regula este conjunto de genes en el sentido que se corresponde con una menor agresividad, lo que permite explicar la menor agresividad que muestran las líneas celulares de melanoma que sobreexpresan PEDF (Abe *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004). Aunque la sobreexpresión de PEDF en la línea celular A375 modula genes de la vía Wnt, la interferencia o sobreexpresión de PEDF en las líneas celulares C81-61 y C8161, respectivamente, no afecta a la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina ni a su translocación al núcleo. El hecho de estar utilizando líneas celulares con diferentes características de agresividad podría ser la causa de esta discrepancia, ya que el estado de la vía podría diferir dependiendo de las distintas alteraciones que puedan tener las líneas celulares. Además, el silenciamiento y la sobreexpresión de PEDF pueden no ser totalmente complementarios.

Adicionalmente, PEDF disminuye la expresión de varios marcadores de melanoma empleados actualmente en la detección clínica del melanoma, como S100- $\beta$  (Utikal *et al.*, 2007); o utilizados como factores pronóstico de la recaída tumoral y la metástasis, como S100- $\beta$  o MIA (Deichmann *et al.*, 1999), lo que refleja, de nuevo, la menor agresividad que poseen los melanomas que mantienen la expresión de este factor. En los últimos años se han intentado establecer nuevos marcadores moleculares que permitan definir el grado de agresividad del melanoma y predecir el riesgo de metástasis. Por ejemplo, la expresión de MITF correlaciona inversamente con la progresión de la enfermedad y directamente con la supervivencia global de los pacientes de melanoma (Salti *et al.*, 2000). Se ha descrito que la mayor expresión en el melanoma de algunas moléculas implicadas en la transición epitelio-mesénquima, como N-cadherina u osteopontina, se asocia con el desarrollo de metástasis en pacientes de melanoma (Alonso *et al.*, 2007). La angiogénesis juega un papel clave en la progresión del melanoma, y se ha asociado la vascularización tumoral con peor pronóstico en melanoma (Kashani-Sabet *et al.*, 2002). En los últimos años, numerosos estudios globales de análisis de la expresión génica han identificado potenciales marcadores, aunque muchos de ellos todavía han de ser evaluados en estudios con biopsias de pacientes (Hoek, 2007). Sin embargo, a pesar de su utilidad, ninguno de estos nuevos marcadores supera a la clasificación histológica convencional, siendo el nivel de Clark de invasión de la dermis y el grosor tumoral de Breslow (Houghton and Polsky, 2002) los factores que mejor predicen el pronóstico del melanoma (Bosserhoff, 2006; Larson *et al.*, 2009; Medic *et al.*, 2007), por lo que se requieren estudios adicionales en los que se identifiquen marcadores más informativos para el pronóstico y seguimiento de esta enfermedad.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la pérdida de expresión de PEDF podría ser un marcador molecular informativo en relación con la malignidad del melanoma. Ya se ha comentado que en un meta-análisis publicado recientemente, PEDF es uno de los factores cuya expresión disminuye significativamente en melanoma con respecto a melanocitos normales (Hoek, 2007). Como primera aproximación para validar su utilidad, nuestro grupo está realizando un estudio en colaboración con J.L. Rodríguez-Peralto basado en el uso de una colección significativa de *tissue arrays* de biopsias de melanoma.

Por otro lado, los resultados presentados en esta Tesis apoyan la utilidad de PEDF como herramienta terapéutica en el tratamiento del melanoma. Como ya se ha comentado, el uso de un factor multifuncional como PEDF permite no sólo destruir la vasculatura tumoral, sino también actuar sobre las propias células tumorales, reduciendo su fenotipo invasivo y su potencial metastásico, en contraposición al uso de factores antiangiogénicos puros como la endostatina o la TSP-1, que afectarían exclusivamente al endotelio tumoral (Folkman, 2004). Los agentes antiangiogénicos que se utilizan actualmente en la clínica en combinación con estrategias convencionales (quimioterapia y radioterapia) tienen efectos muy moderados, conduciendo a un aumento de unos pocos meses en la supervivencia de los pacientes o en el tiempo de progresión de la enfermedad (Hurwitz *et al.*, 2004). La utilización de



agentes antiangiogénicos que combinen otras acciones dirigidas al tumor, como es el caso del factor PEDF, podría ser una alternativa terapéutica más eficaz.

La eficacia terapéutica de PEDF se ha evaluado en modelos de patologías oculares que cursan con angiogénesis excesiva empleando estrategias de terapia génica basadas en vectores adenovirales (Hamilton *et al.*, 2008; Saishin *et al.*, 2005) y vectores asociados a adenovirus (Li *et al.*, 2008). En modelos experimentales de cáncer se ha analizado la eficacia terapéutica de diversos tipos de vectores virales para transducir PEDF *in vivo* (adenovirus-PEDF en melanoma (Wang *et al.*, 2003), lentivirus-PEDF en carcinoma pancreático (Hase *et al.*, 2005) o vectores asociados a adenovirus-PEDF en neuroblastoma (Streck *et al.*, 2005)).

Otros grupos han impulsado la generación de péptidos miméticos de PEDF identificando diversas regiones de pequeño tamaño que retienen varias de las propiedades funcionales asignadas a PEDF (Filleur *et al.*, 2005). El tratamiento sistémico con el péptido 34-mer tiene un potente efecto antitumoral en modelos de carcinoma de próstata (Filleur *et al.*, 2005). Más recientemente se han identificado péptidos de menor tamaño (14-18 aminoácidos) en la secuencia del 34-mer y que estarían más expuestos en la superficie de PEDF (Figura 1b), por lo que tendrían más probabilidad de interaccionar con alguno de los receptores de PEDF. Se ha visto que estos péptidos pequeños son incluso más potentes que el 34-mer para inhibir el crecimiento de carcinomas de próstata y renales (Mirochnik *et al.*, 2009).

La utilización de péptidos miméticos en la terapia antitumoral se impulsó previamente para otro inhibidor endógeno de la angiogénesis, la TSP-1 (Reiher *et al.*, 2002; Tolsma *et al.*, 1993). El desarrollo terapéutico en relación con este factor antiangiogénico está mucho más avanzado, ya que el péptido mimético ABT-510 se encuentra en la actualidad en ensayos clínicos en fase II en carcinoma renal (Ebbinghaus *et al.*, 2007), melanoma (Markovic *et al.*, 2007) y sarcoma de tejidos blandos (Baker *et al.*, 2008).

El potencial terapéutico de PEDF en melanoma y la posibilidad de utilizar a este factor como un nuevo marcador de este tipo de tumores se ven apoyados por los resultados descritos en esta Tesis, que demuestran que PEDF restringe la invasividad y agresividad del melanoma mediante la modulación de sus propiedades migratorias e invasivas, su plasticidad y su potencial metastásico. La expresión elevada de PEDF en los melanocitos cutáneos se pierde en la progresión maligna del melanoma, aunque algunos melanomas poco agresivos mantienen una expresión alta pero heterogénea de este factor, como consecuencia de la reprogramación de su expresión durante el proceso de metástasis. Esta heterogeneidad en la expresión de PEDF abre una interesante ventana terapéutica en el tratamiento de los pacientes de melanoma, ya que se esperaría que la reexpresión de PEDF en las células negativas condujese a una reversión hacia un fenotipo menos agresivo e invasivo, lo que se podría traducir en un aumento de la supervivencia de estos pacientes.

Por otra parte, PEDF modifica la expresión de MLPH y RAB27A, dos moléculas clave en el transporte de los melanosomas (Barral and Seabra, 2004). Se ha descrito la presencia de PEDF en los

melanosomas inmaduros de células de melanoma (Chi *et al.*, 2006), y la implicación de este factor en la producción de pigmento, a través de la inducción de la tirosinasa (Abul-Hassan *et al.*, 2000), y en la maduración de los melanosomas en células RPE (Malchiodi-Albedi *et al.*, 1998). En esta Tesis hemos demostrado la relevancia funcional de PEDF en la homeostasis de los melanocitos, ya que PEDF controla la proliferación de los melanocitos y restringe su potencial migratorio. Adicionalmente, la modulación por PEDF de la expresión de MLPH y RAB27A sugiere que este factor podría modular procesos más específicos del linaje melanocítico, como la melanogénesis.

## **CONCLUSIONES**

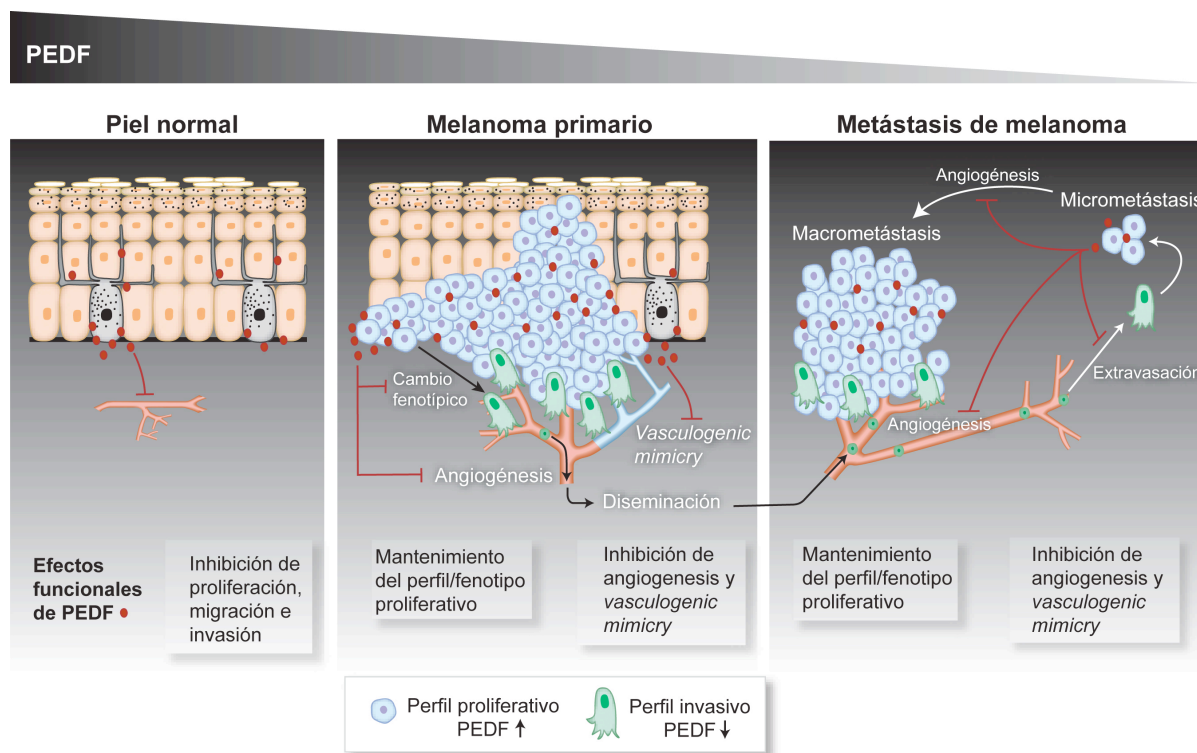


1. PEDF se expresa a niveles elevados en los melanocitos cutáneos. El silenciamiento de la expresión de PEDF estimula la proliferación y el potencial migratorio e invasivo de los melanocitos.
2. PEDF se expresa a niveles similares en los melanocitos y en algunas líneas celulares establecidas a partir de melanomas clasificados según criterios histopatológicos en fase radial o vertical; sin embargo, su expresión se pierde de forma más generalizada en líneas celulares establecidas a partir de metástasis de melanoma.
3. Mediante el análisis de estudios de expresión génica global en series amplias de líneas celulares de melanoma, clasificadas por la combinación de criterios moleculares y funcionales en perfiles de expresión proliferativo e invasivo; encontramos que PEDF se expresa a niveles elevados en el cohorte de melanomas proliferativos, mientras que su expresión se pierde en el cohorte de melanomas invasivos.
4. En una pareja de líneas celulares de melanoma establecidas a partir de la misma metástasis de un paciente de melanoma y que presentan características opuestas de agresividad, PEDF solamente se expresa en la línea celular poco agresiva. La expresión de PEDF es, además, heterogénea en biopsias procedentes de metástasis de melanoma en piel y en nódulos linfáticos. Estos resultados son consistentes con la reprogramación de la expresión de PEDF durante el proceso de metástasis del melanoma.
5. El silenciamiento de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas conduce a un aumento de sus propiedades migratorias e invasivas y les confiere la capacidad de formar redes vasculogénicas; propiedades que, en conjunto, determinan una mayor agresividad de estas líneas celulares de melanoma modificadas.
6. El silenciamiento de la expresión de PEDF conduce a un aumento en la capacidad de colonización del pulmón en modelos experimentales de metástasis por inyección de células de melanoma en la vena de la cola de ratones inmunodeprimidos; así como a una mayor capacidad de formación de metástasis desde un tumor primario en modelos experimentales de metástasis espontánea de melanoma. Por lo tanto, la adquisición de propiedades migratorias e invasivas como consecuencia de la pérdida de expresión de PEDF contribuye a un mayor potencial metastásico *in vivo*.

7. El silenciamiento de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma no implica cambios significativos en la expresión de E-cadherina o MITF, ni alteraciones en el funcionamiento de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. En consecuencia, el mecanismo molecular que media los efectos funcionales de PEDF en el melanoma no se basa en la interferencia con los factores o rutas identificadas previamente como esenciales para el control de la malignización del melanoma.

8. PEDF modula en las células de melanoma la expresión de múltiples genes implicados en el control de la vascularización, entre los que validamos interleuquina 8 (*IL8*) y colágeno IV (*COL4A2*). Los cambios inducidos por PEDF en la expresión de este grupo de genes determinan una menor capacidad de las células de melanoma para activar la vascularización de la lesión tumoral.

9. PEDF modula la expresión de genes previamente implicados en definir la agresividad o malignización del melanoma, entre los que validamos galectina 3 (*LGALS3*), *jagged* 1 (*JAG1*), proteína de unión a factores tipo insulina 3 (*IGFBP3*) y factor de crecimiento de fibroblastos 13 (*FGF13*). Los cambios inducidos por PEDF en la expresión de este grupo de genes se corresponden con un perfil de expresión característico de células de melanoma menos agresivas.



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y *et al.* (2004). Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* **164**: 1225-32.
- Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE.(2003). Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg* **38**: 336-42; discussion 336-42.
- Abul-Hassan K, Walmsley R, Tombran-Tink J, Boulton M.(2000). Regulation of tyrosinase expression and activity in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Pigment Cell Res* **13**: 436-41.
- Adams AE, Chudnovsky Y, Khavari PA.(2006). Oxygen deprivation provokes melanoma. *Nat Med* **12**: 168-9.
- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB.(1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **282**: 615-6.
- Alberdi E, Hyde CC, Becerra SP.(1998). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site. *Biochemistry* **37**: 10643-52.
- Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP.(1999). Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* **274**: 31605-12.
- Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M *et al.*(2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* **67**: 3450-60.
- Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F *et al.*(2006). Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 4121-9.
- Aymerich MS, Alberdi EM, Martinez A, Becerra SP.(2001). Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 3287-93.
- Bachmann IM, Straume O, Puntervoll HE, Kalvenes MB, Akslen LA.(2005). Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* **11**: 8606-14.
- Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Hendrix MJ.(2006). Biological functions of maspin. *J Cell Physiol* **209**: 617-24.
- Baker LH, Rowinsky EK, Mendelson D, Humerickhouse RA, Knight RA, Qian J *et al.*(2008). Randomized, phase II study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* **26**: 5583-8.
- Barnhill RL, Xiao M, Graves D, Antoniades HN.(1996). Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-A, PDGF-B and the PDGF-alpha receptor, but not the PDGF-beta receptor, in human malignant melanoma in vivo. *Br J Dermatol* **135**: 898-904.
- Barnstable CJ, Tombran-Tink J.(2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* **23**: 561-77.
- Barral DC, Seabra MC.(2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res* **17**: 111-8.
- Becerra SP, Perez-Mediavilla LA, Weldon JE, Locatelli-Hoops S, Senanayake P, Notari L *et al.*(2008). Pigment epithelium-derived factor binds to hyaluronan. Mapping of a hyaluronan binding site. *J Biol Chem* **283**: 33310-20.
- Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V.(1995). Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* **270**: 25992-9.
- Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB.(2005). The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* **8**: 443-54.
- Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H *et al.*(2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *Embo J* **27**: 792-803.
- Bennett DC.(2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* **22**: 3063-9.
- Bernard A, Gao-Li J, Franco CA, Bouceba T, Huet A, Li Z.(2009). Laminin Receptor Involvement in the Anti-angiogenic Activity of Pigment Epithelium-derived Factor. *J Biol Chem* **284**: 10480-90.

- Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncel RW.(2002). Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* **22**: 9378-86.
- Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW.(1999). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 719-28.
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M *et al.*(2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* **406**: 536-40.
- Blacque OE, Worrall DM.(2002). Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. *J Biol Chem* **277**: 10783-8.
- Bosserhoff AK.(2006). Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin Chim Acta* **367**: 28-35.
- Bouck N.(1990). Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* **2**: 179-85.
- Bouck N.(2002). PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* **8**: 330-4.
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J.(2007). Hypoxia and cancer. *J Mol Med* **85**: 1301-7.
- Cai J, Parr C, Watkins G, Jiang WG, Boulton M.(2006). Decreased pigment epithelium-derived factor expression in human breast cancer progression. *Clin Cancer Res* **12**: 3510-7.
- Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF.(1999). Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* **57**: 789-800.
- Carmeliet P.(2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**: 389-95.
- Carmeliet P.(2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**: 932-6.
- Carmeliet P, Jain RK.(2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-57.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS *et al.*(2006). Mitf regulation of *Dial* controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* **20**: 3426-39.
- Ch'ng S, Tan ST.(2009). Genetics, cellular biology and tumor microenvironment of melanoma. *Front Biosci* **14**: 918-28.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC.(2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-72.
- Chang K, Elledge SJ, Hannon GJ.(2006). Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries. *Nat Methods* **3**: 707-14.
- Chi A, Valencia JC, Hu ZZ, Watabe H, Yamaguchi H, Mangini NJ *et al.*(2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* **5**: 3135-44.
- Chiellini C, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G *et al.*(2008). Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* **9**: 26.
- Chin L.(2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* **3**: 559-70.
- Clark WH, Jr.(1991). Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev* **10**: 83-88.
- Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G *et al.*(2002). Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* **8**: 3728-33.
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C *et al.*(1994). A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* **180**: 35-42.
- Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O *et al.*(2001). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* **114**: 4421-8.
- Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS.(2008). Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis. *Cancer Res* **68**: 4500-5.
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW.(2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **6**: 184-92.

- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.(1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* **265**: 1582-4.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S *et al.*(2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.
- Davison PM, Bensch K, Karasek MA.(1980). Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J Invest Dermatol* **75**: 316-21.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W *et al.*(1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**: 245-8.
- de Snoo FA, Kroon MW, Bergman W, ter Huurne JA, Houwing-Duistermaat JJ, van Mourik L *et al.*(2007). From sporadic atypical nevi to familial melanoma: risk analysis for melanoma in sporadic atypical nevus patients. *J Am Acad Dermatol* **56**: 748-52.
- DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG.(1999). Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **56**: 604-10.
- Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V *et al.*(1999). S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* **17**: 1891-6.
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M *et al.*(2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* **21**: 2923-35.
- Demunter A, Libbrecht L, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ.(2002). Loss of membranous expression of beta-catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations. *Mod Pathol* **15**: 454-61.
- Denk AE, Bettstetter M, Wild PJ, Hoek K, Bataille F, Dietmaier W *et al.*(2007). Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* **20**: 112-9.
- Diaz R, Pena C, Silva J, Lorenzo Y, Garcia V, Garcia JM *et al.*(2008). p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* **123**: 1060-7.
- Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Munoz C *et al.*(1995). Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* **95**: 1756-65.
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD *et al.*(2007). The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* **282**: 17259-71.
- Doetsch F.(2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 543-50.
- Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP *et al.*(2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* **9**: 774-80.
- Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, Futscher BW.(2000). Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. *Int J Cancer* **85**: 805-10.
- Doyon G, St-Jean S, Darsigny M, Asselin C, Boudreau F.(2009). Nuclear Receptor Co-repressor Is Required to Maintain Proliferation of Normal Intestinal Epithelial Cells in Culture and Down-modulates the Expression of Pigment Epithelium-derived Factor. *J Biol Chem* **284**: 25220-9.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP.(1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**: 379-87.
- Ebbinghaus S, Hussain M, Tannir N, Gordon M, Desai AA, Knight RA *et al.*(2007). Phase 2 study of ABT-510 in patients with previously untreated advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 6689-95.
- Ek ET, Dass CR, Choong PF.(2006). PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med* **12**: 497-502.

- Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM.(1997). Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res* **7 Suppl 2**: S19-26.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S *et al.*(2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* **65**: 9328-37.
- Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM.(2007). Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* **25**: 1606-20.
- Fernandez-Garcia NI, Volpert OV, Jimenez B.(2007). Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional antitumor factor. *J Mol Med* **85**: 15-22.
- Fidler IJ.(1986). Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **5**: 29-49.
- Fidler IJ.(2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-8.
- Fidler IJ, Pollack VA, Hanna N (1984). The use of nude mice for studies of cancer metastases. In: Sordat B (ed). *Immune-deficient animals*. pp 328-338.
- Filleur S, Nelius T, de Riese W, Kennedy RC.(2009). Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem* **106**: 769-75.
- Filleur S, Volz K, Nelius T, Mirochnik Y, Huang H, Zaichuk TA *et al.*(2005). Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* **65**: 5144-52.
- Fitzpatrick TB, Breathnach AS.(1963). [the Epidermal Melanin Unit System.]. *Dermatol Wochenschr* **147**: 481-9.
- Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ.(2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **156**: 361-81.
- Folkman J.(1975). Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* **82**: 96-100.
- Folkman J.(2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* **112**: 496-507.
- Francis MK, Appel S, Meyer C, Balin SJ, Balin AK, Cristofalo VJ.(2004). Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J Invest Dermatol* **122**: 1096-105.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V.(2008). Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* **319**: 195-8.
- Garcia M, Fernandez-Garcia NI, Rivas V, Carretero M, Escamez MJ, Gonzalez-Martin A *et al.*(2004). Inhibition of xenografted human melanoma growth and prevention of metastasis development by dual antiangiogenic/antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Res* **64**: 5632-42.
- Garcia-Lopez MA, Barreiro O, Garcia-Diez A, Sanchez-Madrid F, Penas PF.(2005). Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility. *J Invest Dermatol* **125**: 1001-9.
- Garraway LA, Sellers WR.(2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 593-602.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S *et al.*(2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**: 117-22.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H *et al.*(1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-23.
- Giovanella BC, Fogh J.(1985). The nude mouse in cancer research. *Adv Cancer Res* **44**: 69-120.
- Gonzalez-Cao M, Viteri S, Diaz-Lagares A, Gonzalez A, Redondo P, Nieto Y *et al.*(2008). Preliminary results of the combination of bevacizumab and weekly Paclitaxel in advanced melanoma. *Oncology* **74**: 12-6.
- Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S *et al.*(2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**: 1098-103.

- Goodall J, Carreira S, Denat L, Kobi D, Davidson I, Nuciforo P *et al.*(2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* **68**: 7788-94.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R.(2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**: 851-7.
- Griffiths AJF, Miller JH, Lewontin RC, Gelbart WM (2000). *An Introduction to Genetic Analysis.*, 7th edn: San Francisco.
- Guan M, Pang CP, Yam HF, Cheung KF, Liu WW, Lu Y.(2004). Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther* **11**: 325-32.
- Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW *et al.*(2003). Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol* **56**: 277-82.
- Guilford P.(1999). E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* **5**: 172-7.
- Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA.(2009a). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* **15**: 1010-2.
- Gupta PB, Kuperwasser C, Brunet JP, Ramaswamy S, Kuo WL, Gray JW *et al.*(2005). The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet* **37**: 1047-54.
- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA *et al.*(2009b). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* **138**: 645-59.
- Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M.(2005). Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* **18**: 150-9.
- Halin S, Wikstrom P, Rudolfsson SH, Stattin P, Doll JA, Crawford SE *et al.*(2004). Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* **64**: 5664-71.
- Hamilton MM, Byrnes GA, Gall JG, Brough DE, King CR, Wei LL.(2008). Alternate serotype adenovector provides long-term therapeutic gene expression in the eye. *Mol Vis* **14**: 2535-46.
- Hanahan D, Folkman J.(1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-64.
- Hanahan D, Weinberg RA.(2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL *et al.*(2005). The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6092-7.
- Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker EB *et al.*(1999). Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* **59**: 1578-83.
- Hase R, Miyamoto M, Uehara H, Kadoya M, Ebihara Y, Murakami Y *et al.*(2005). Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice. *Clin Cancer Res* **11**: 8737-44.
- Hayward NK.(2003). Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* **22**: 3053-62.
- He L, Hannon GJ.(2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**: 522-531.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE.(2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* **3**: 411-21.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA *et al.*(2001). Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8018-23.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM.(2007). Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* **7**: 246-55.
- Herlyn D, Iliopoulos D, Jensen PJ, Parmiter A, Baird J, Hotta H *et al.*(1990). In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice. *Cancer Res* **50**: 2296-302.
- Hess AR, Margaryan NV, Seftor EA, Hendrix MJ.(2007). Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* **236**: 3283-96.

- Hirohashi S.(1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* **153**: 333-9.
- Hjelmeland LM, Cristofolo VJ, Funk W, Rakoczy E, Katz ML.(1999). Senescence of the retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **5**: 33.
- Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A *et al.*(2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* **64**: 5270-82.
- Hoek KS.(2007). DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines. *Pigment Cell Res* **20**: 466-84.
- Hoek KS.(2009). Melanoma progression, gene expression and DNA microarrays. *G Ital Dermatol Venereol* **144**: 39-49.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L *et al.*(2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* **68**: 650-6.
- Hoek KS, Eichhoff OM, Widmer D, Dummer R.(2009). Stemming the flood. *Pigment Cell Melanoma Res* **22**: 6-7.
- Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, Sucker A, Ugurel S, Kumar R *et al.*(2006). Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res* **19**: 290-302.
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J.(1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* **1**: 149-53.
- Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E *et al.*(1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol* **412**: 506-14.
- Houghton AN, Polsky D.(2002). Focus on melanoma. *Cancer Cell* **2**: 275-8.
- Hsu MY, Meier F, Herlyn M.(2002). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**: 522-36.
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M.(1996). Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**: 188-94.
- Huang Q, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N.(2008). PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Exp Eye Res* **87**: 226-41.
- Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC.(2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* **152**: 795-808.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W *et al.*(2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**: 2335-42.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U *et al.*(2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-64.
- Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ.(1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* **4**: 549-53.
- Jimenez B, Volpert OV.(2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J Mol Med* **78**: 663-72.
- Johansson P, Pavey S, Hayward N.(2007). Confirmation of a BRAF mutation-associated gene expression signature in melanoma. *Pigment Cell Res* **20**: 216-21.
- Juhasz I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D *et al.*(1993). Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* **143**: 528-37.
- Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono T.(2001). Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br J Dermatol* **145**: 210-6.
- Kalluri R.(2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**: 422-33.
- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd.(2002). Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **20**: 1826-31.

- Kimelman D, Xu W.(2006). Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**: 7482-91.
- Kozaki K, Miyaishi O, Koiwai O, Yasui Y, Kashiwai A, Nishikawa Y *et al.*(1998). Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, caspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* **273**: 15125-30.
- Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S *et al.*(2000). Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* **115**: 1000-7.
- Larson AR, Konat E, Alani RM.(2009). Melanoma biomarkers: current status and vision for the future. *Nat Clin Pract Oncol* **6**: 105-17.
- Larue L, Luciani F, Kumasaka M, Champeval D, Demirkan N, Bonaventure J *et al.*(2009). Bypassing melanocyte senescence by beta-catenin: A novel way to promote melanoma. *Pathol Biol (Paris)*.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE.(2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* **12**: 406-14.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M.(2001a). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**: 3819-25.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M.(2002). Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**: 62-70.
- Li G, Schaidt H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M.(2001b). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* **20**: 8125-35.
- Li Q, Miller R, Han PY, Pang J, Dinculescu A, Chiodo V *et al.*(2008). Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol Vis* **14**: 1760-9.
- Lin JY, Fisher DE.(2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**: 843-50.
- Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S.(2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res* **68**: 8104-12.
- Liu G, Zhang F, Lee J, Dong Z.(2005). Selective induction of interleukin-8 expression in metastatic melanoma cells by transforming growth factor-beta 1. *Cytokine* **31**: 241-9.
- Liu H, Ren JG, Cooper WL, Hawkins CE, Cowan MR, Tong PY.(2004). Identification of the antivasopermeability effect of pigment epithelium-derived factor and its active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6605-10.
- Liu W, Wu Z, Guan M, Lu Y.(2009). cDNA microarray analysis of pigment epithelium-derived factor-regulated gene expression profile in prostate carcinoma cells. *Int J Urol* **16**: 323-8.
- Lomuto M, Calabrese P, Giuliani A.(2004). Prognostic signs in melanoma: state of the art. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **18**: 291-300.
- Magnoni C, Tenedini E, Ferrari F, Benassi L, Bernardi C, Gualdi G *et al.*(2007). Transcriptional profiles in melanocytes from clinically unaffected skin distinguish the neoplastic growth pattern in patients with melanoma. *Br J Dermatol* **156**: 62-71.
- Mahabeshwar GH, Byzova TV.(2007). Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol* **34**: 555-65.
- Mahtabifard A, Merritt RE, Yamada RE, Crystal RG, Korst RJ.(2003). In vivo gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits tumor growth in syngeneic murine models of thoracic malignancies. *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**: 28-38.
- Maik-Rachline G, Seger R.(2006). Variable phosphorylation states of pigment-epithelium-derived factor differentially regulate its function. *Blood* **107**: 2745-52.
- Maik-Rachline G, Shaltiel S, Seger R.(2005). Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. *Blood* **105**: 670-8.
- Malchiodi-Albedi F, Feher J, Caiazza S, Formisano G, Perilli R, Falchi M *et al.*(1998). PEDF (pigment epithelium-derived factor) promotes increase and maturation of pigment granules in pigment epithelial cells in neonatal albino rat retinal cultures. *Int J Dev Neurosci* **16**: 423-32.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J *et al.*(1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **155**: 739-52.

- Marcovall J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M *et al.*(1997). Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol* **24**: 212-8.
- Markovic SN, Suman VJ, Rao RA, Ingle JN, Kaur JS, Erickson LA *et al.*(2007). A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* **30**: 303-9.
- Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K.(2004). Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **40**: 252-9.
- McGill GG, Haq R, Nishimura EK, Fisher DE.(2006). c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J Biol Chem* **281**: 10365-73.
- Medic S, Pearce RL, Heenan PJ, Ziman M.(2007). Molecular markers of circulating melanoma cells. *Pigment Cell Res* **20**: 80-91.
- Melnikova VO, Bar-Eli M.(2006). Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8. *Pigment Cell Res* **19**: 395-405.
- Meyer C, Notari L, Becerra SP.(2002). Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *J Biol Chem* **277**: 45400-7.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM *et al.*(2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**: 720-4.
- Miller AJ, Mihm MC, Jr.(2006). Melanoma. *N Engl J Med* **355**: 51-65.
- Mirochnik Y, Aurora A, Schulze-Hoepfner FT, Deabes A, Shifrin V, Beckmann R *et al.*(2009). Short pigment epithelial-derived factor-derived peptide inhibits angiogenesis and tumor growth. *Clin Cancer Res* **15**: 1655-63.
- Moore KA, Lemischka IR.(2006). Stem cells and their niches. *Science* **311**: 1880-5.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD.(1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* **257**: 1248-51.
- Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M.(2008). Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **173**: 1839-52.
- Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K.(1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* **265**: 21128-33.
- Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, Etoh T *et al.*(2001). Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 8-15.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J.(2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**: 274-84.
- Nguyen DX, Massague J.(2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8**: 341-52.
- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C *et al.*(2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* **281**: 38022-37.
- Notari L, Miller A, Martinez A, Amaral J, Ju M, Robinson G *et al.*(2005). Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 2736-47.
- Nowell PC.(1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-8.
- Nurnberg W, Tobias D, Otto F, Henz BM, Schadendorf D.(1999). Expression of interleukin-8 detected by in situ hybridization correlates with worse prognosis in primary cutaneous melanoma. *J Pathol* **189**: 546-51.
- O'Connell MP, Weeraratna AT.(2009). Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res*.
- Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J.(2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* **16**: 197-200.



- Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, Ordonez-Moran P, Pena C, Peiro S *et al.*(2004). The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* **10**: 917-9.
- Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ *et al.*(2009). Analyses of Resected Human Brain Metastases of Breast Cancer Reveal the Association between Up-Regulation of Hexokinase 2 and Poor Prognosis. *Mol Cancer Res*.
- Papp T, Pemsel H, Rollwitz I, Schipper H, Weiss DG, Schiffmann D *et al.*(2003). Mutational analysis of N-ras, p53, CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDK4, and MC1R genes in human dysplastic melanocytic naevi. *J Med Genet* **40**: E14.
- Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC.(2005). Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detect Prev* **29**: 260-6.
- Pavey S, Johansson P, Packer L, Taylor J, Stark M, Pollock PM *et al.*(2004). Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* **23**: 4060-7.
- Pecina-Slaus N, Zigmund M, Kusec V, Martic TN, Cacic M, Slaus M.(2007). E-cadherin and beta-catenin expression patterns in malignant melanoma assessed by image analysis. *J Cutan Pathol* **34**: 239-46.
- Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T, 3rd, Morton RF, Jilani SZ *et al.*(2009). Phase 2 trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N047A. *Cancer* **115**: 119-27.
- Pignolo RJ, Cristofalo VJ, Rotenberg MO.(1993). Senescent WI-38 cells fail to express EPC-1, a gene induced in young cells upon entry into the G0 state. *J Biol Chem* **268**: 8949-57.
- Pinnix CC, Herlyn M.(2007). The many faces of Notch signaling in skin-derived cells. *Pigment Cell Res* **20**: 458-65.
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudit LM, Stark M, Robbins CM *et al.*(2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**: 19-20.
- Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ.(2006). Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res* **66**: 7833-6.
- Pumiglia K, Temple S.(2006). PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche. *Nat Neurosci* **9**: 299-300.
- Punzon I, Criado LM, Serrano A, Serrano F, Bernad A.(2004). Highly efficient lentiviral-mediated human cytokine transgenesis on the NOD/scid background. *Blood* **103**: 580-2.
- Qingyi Z, Lin Y, Junhong W, Jian S, Weizhou H, Long M *et al.*(2009). Unfavorable prognostic value of human PEDF decreased in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a differential proteomics approach. *Cancer Invest* **27**: 794-801.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ.(2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**: 593-8.
- Raingeaud J, Pierre J.(2005). Interleukin-4 downregulates TNFalpha-induced IL-8 production in keratinocytes. *FEBS Lett* **579**: 3953-9.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P *et al.*(2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* **9**: 331-9.
- Reed JA, McNutt NS, Albino AP.(1994). Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol* **144**: 329-36.
- Reid TW, Albert DM, Rabson AS, Russell P, Craft J, Chu EW *et al.*(1974). Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* **53**: 347-60.
- Reiher FK, Volpert OV, Jimenez B, Crawford SE, Dinney CP, Henkin J *et al.*(2002). Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer* **98**: 682-9.
- Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER.(1999). Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* **154**: 325-9.
- Robertson GP.(2005). Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 273-85.

- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P.(1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**: 1790-2.
- Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM.(2007). Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS ONE* **2**: e594.
- Saishin Y, Silva RL, Saishin Y, Kachi S, Aslam S, Gong YY *et al.*(2005). Periocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization in a human-sized eye. *Hum Gene Ther* **16**: 473-8.
- Salti GI, Manouagian T, Farolan M, Shilkaitis A, Majumdar D, Das Gupta TK.(2000). Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* **60**: 5012-6.
- Sarojini H, Estrada R, Lu H, Dekova S, Lee MJ, Gray RD *et al.*(2008). PEDF from mouse mesenchymal stem cell secretome attracts fibroblasts. *J Cell Biochem* **104**: 1793-802.
- Sasaki Y, Naishiro Y, Oshima Y, Imai K, Nakamura Y, Tokino T.(2005). Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* **24**: 5131-6.
- Satyamoorthy K, DeJesus E, Linnenbach AJ, Kraj B, Kornreich DL, Rendle S *et al.*(1997). Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analyses. *Melanoma Res* **7 Suppl 2**: S35-42.
- Sawant S, Aparicio S, Tink AR, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J.(2004). Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* **325**: 408-13.
- Schatton T, Frank MH.(2008). Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 39-55.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M *et al.*(2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**: 345-9.
- Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA.(2002). Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* **15**: 433-9.
- Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A *et al.*(2005). Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* **65**: 10164-9.
- Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA *et al.*(2002). Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* **44**: 17-27.
- Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra SP, Chader GJ, Diloreto DA, Jr., del Cerro C *et al.*(1994). Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors* **10**: 289-97.
- Selzer E, Wacheck V, Lucas T, Heere-Ress E, Wu M, Weilbaecher KN *et al.*(2002). The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res* **62**: 2098-103.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D.(1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**: 704-7.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ.(2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **138**: 822-9.
- Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP.(2005). Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* **65**: 2412-21.
- Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ *et al.*(2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* **37**: 1281-8.
- Simonovic M, Gettins PG, Volz K.(2001). Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11131-5.
- Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ.(1994). Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* **54**: 3242-7.
- Slingluff CL, Jr., Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF.(1988). Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* **208**: 150-61.

- Slominski A, Pisarchik A, Wortsman J.(2004). Expression of genes coding melatonin and serotonin receptors in rodent skin. *Biochim Biophys Acta* **1680**: 67-70.
- Smalley KS, Herlyn M.(2009). Integrating tumor-initiating cells into the paradigm for melanoma targeted therapy. *Int J Cancer* **124**: 1245-50.
- Soengas MS, Lowe SW.(2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**: 3138-51.
- Sordat BCM, Ueyama Y, Fogh J (1982). Metastasis of tumor xenografts in the nude mouse. In: Fogh J and Giovanella A (eds). *The nude mouse in experimental and clinical research*. Academic Press: New York. pp 95-143.
- Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW *et al.*(2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* **64**: 7002-10.
- Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J.(1993). Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1526-30.
- Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N.(2001). Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2593-7.
- Streck CJ, Zhang Y, Zhou J, Ng C, Nathwani AC, Davidoff AM.(2005). Adeno-associated virus vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth. *J Pediatr Surg* **40**: 236-43.
- Streit M, Detmar M.(2003). Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* **22**: 3172-9.
- Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T.(2005). Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells. *Life Sci* **77**: 3231-41.
- Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA.(1994). E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* **107** ( Pt 4): 983-92.
- Thomas AJ, Erickson CA.(2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**: 598-610.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N.(1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* **122**: 497-511.
- Tombran-Tink J, Aparicio S, Xu X, Tink AR, Lara N, Sawant S *et al.*(2005). PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J Struct Biol* **151**: 130-50.
- Tombran-Tink J, Barnstable CJ.(2003). PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* **4**: 628-36.
- Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV.(1991). PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res* **53**: 411-4.
- Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E *et al.*(1996). Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* **2**: 11.
- Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW *et al.*(2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* **12**: 925-32.
- Tresini M, Pignolo RJ, Allen RG, Cristofalo VJ.(1999). Effects of donor age on the expression of a marker of replicative senescence (EPC-1) in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **179**: 11-7.
- Tsao H, Zhang X, Majewski P, Haluska FG.(1999). Mutational and expression analysis of the p73 gene in melanoma cell lines. *Cancer Res* **59**: 172-4.
- Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H *et al.*(2004). Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **64**: 3533-7.
- Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S.(2007). Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res* **298**: 469-77.

- Vachtenheim J, Novotna H, Ghanem G.(2001). Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol* **117**: 1505-11.
- van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA *et al.*(2004). Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1473-7.
- Van Muijen GN, Cornelissen LM, Jansen CF, Figdor CG, Johnson JP, Brocker EB *et al.*(1991). Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin Exp Metastasis* **9**: 259-72.
- Varker KA, Biber JE, Kefauver C, Jensen R, Lehman A, Young D *et al.*(2007). A randomized phase 2 trial of bevacizumab with or without daily low-dose interferon alfa-2b in metastatic malignant melanoma. *Ann Surg Oncol* **14**: 2367-76.
- Villanueva J, Herlyn M (2009). Melanoma. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Visvader JE, Lindeman GJ.(2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**: 755-68.
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM *et al.*(2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* **8**: 349-57.
- Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K *et al.*(2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* **13**: 1070-7.
- Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C.(2003). Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol Ther* **8**: 72-9.
- Weeraratna AT.(2005). A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 237-50.
- Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M *et al.*(2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* **1**: 279-88.
- Weissman IL.(2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**: 1442-6.
- Welch DR, Bisi JE, Miller BE, Conaway D, Seftor EA, Yohem KH *et al.*(1991). Characterization of a highly invasive and spontaneously metastatic human malignant melanoma cell line. *Int J Cancer* **47**: 227-37.
- Wellbrock C, Marais R.(2005). Elevated expression of MITF counteracts B-Raf-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* **170**: 703-8.
- Widlund HR, Fisher DE.(2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* **22**: 3035-41.
- Wu H, Goel V, Haluska FG.(2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**: 3113-22.
- Wu XS, Rao K, Zhang H, Wang F, Sellers JR, Matesic LE *et al.*(2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* **4**: 271-8.
- Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F.(2004). A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association* **99**: 909-917.
- Xia X, Lemieux ME, Li W, Carroll JS, Brown M, Liu XS *et al.*(2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4260-5.
- Xu L, Fidler IJ.(2000). Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**: 4610-6.
- Xu L, Xie K, Mukaida N, Matsushima K, Fidler IJ.(1999). Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **59**: 5822-9.
- Xu X, Zhang SS, Barnstable CJ, Tombran-Tink J.(2006). Molecular phylogeny of the antiangiogenic and neurotrophic serpin, pigment epithelium derived factor in vertebrates. *BMC Genomics* **7**: 248.
- Yabe T, Wilson D, Schwartz JP.(2001). NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* **276**: 43313-9.

- Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Abe R, Shimizu T, Yoshimura A *et al.*(2004). Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol* **37**: 497-506.
- Yang M, Jiang P, An Z, Baranov E, Li L, Hasegawa S *et al.*(1999). Genetically fluorescent melanoma bone and organ metastasis models. *Clin Cancer Res* **5**: 3549-59.
- Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV.(2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* **199**: 1513-22.
- Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC, Slominski A.(2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol* **3**: 569-585.
- Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N.(2000). Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* **6**: 196-9.
- Zhang T, Guan M, Xu C, Chen Y, Lu Y.(2007). Pigment epithelium-derived factor inhibits glioma cell growth in vitro and in vivo. *Life Sci* **81**: 1256-63.
- Zhuang D, Mannava S, Grachtchouk V, Tang WH, Patil S, Wawrzyniak JA *et al.*(2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. *Oncogene* **27**: 6623-34.
- Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S *et al.*(1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* **263**: 526-9.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ *et al.*(1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**: 97-9.



**ANEXO**





## PUBLICACIONES

La mayor parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en el artículo:

Orgaz JL, Ladhani O, Hoek KS, Fernandez-Barral A, Mihic D, Aguilera O *et al.*(2009). 'Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma'. *Oncogene advance online publication*, 21 September 2009; doi:10.1038/onc.2009.284.

## OTRAS PUBLICACIONES

Orgaz JL, Martinez-Poveda B, Fernandez-Garcia NI, Jimenez B.(2008). Following up tumour angiogenesis: from the basic laboratory to the clinic. *Clin Transl Oncol* **10**: 468-77.



El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) es una glicoproteína secretada multifuncional que presenta una potente actividad antitumoral basada en su acción dual sobre la vasculatura tumoral (efectos antiangiogénicos) y sobre las células tumorales (efectos antitumorales directos). Resultados previos del laboratorio mostraron que la sobre-expresión de PEDF es capaz de restringir la colonización de diversos órganos, como pulmón e hígado, en modelos experimentales de metástasis de melanoma en ratón.

En este trabajo mostramos que PEDF se secreta a niveles elevados por los melanocitos de la piel, y que su expresión se pierde durante la progresión maligna del melanoma. PEDF se expresa en líneas celulares establecidas a partir de biopsias de melanomas clasificados según criterios histopatológicos en la fase radial o vertical, a niveles similares a los encontrados en melanocitos. Sin embargo, su expresión se pierde en líneas celulares establecidas a partir de metástasis de melanoma. Mediante el análisis de estudios de expresión global en series amplias de líneas celulares de melanoma clasificadas por la combinación de criterios moleculares y funcionales en perfiles de expresión proliferativo e invasivo, encontramos que PEDF se expresa a niveles elevados en el cohorte de melanomas proliferativos, mientras que su expresión se pierde en el cohorte de melanomas invasivos. En una pareja de líneas celulares de melanoma establecidas a partir de la misma metástasis de un paciente de melanoma y que presentan características opuestas de agresividad, PEDF solamente se expresa en la línea celular poco agresiva. La expresión de PEDF es, además, heterogénea en biopsias procedentes de metástasis de melanoma cutáneas y en nódulos linfáticos. Estos resultados son consistentes con la reprogramación de la expresión de PEDF durante el proceso de metástasis del melanoma. El silenciamiento de la expresión de PEDF en líneas celulares de melanoma poco agresivas aumenta su capacidad migratoria e invasiva y les confiere la capacidad de formar redes vasculogénicas. La adquisición de estas propiedades confiere a las células de melanoma en las que se ha anulado la expresión de PEDF una mayor agresividad, que se manifiesta en un aumento de su potencial metastático en modelos de colonización del pulmón y metástasis espontáneas en ratón. Además, demostramos que el silenciamiento de la expresión de PEDF en melanocitos primarios aumenta sus propiedades migratorias e invasivas y estimula su proliferación.

En consonancia con los resultados anteriores, los cambios en la expresión génica inducidos por la sobreexpresión de PEDF conducen a un perfil de expresión característico de células de melanoma menos agresivas. PEDF disminuye la expresión de múltiples genes implicados en el control del fenotipo angiogénico de las células de melanoma, así como de genes relevantes en el control de migración, invasión y agresividad del melanoma.

Nuestros resultados demuestran que PEDF controla aspectos básicos de la biología del melanocito y del melanoma, y que su pérdida permite a las células de melanoma adquirir un fenotipo más invasivo y agresivo, por lo que la modulación de la expresión de PEDF podría ser crítica para la progresión maligna de este tipo de cáncer.

